

A4 JPO

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-507499

(P2004-507499A)

(43) 公表日 平成16年3月11日(2004.3.11)

(51) Int. Cl.⁷

A61K 31/352

A61K 31/7048

A61P 19/10

// C07D 311/30

C07H 17/07

FI

A61K 31/352

A61K 31/7048

A61P 19/10

C07D 311/30

C07H 17/07

テーマコード (参考)

4C057

4C062

4C086

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 63 頁)

(21) 出願番号 特願2002-522883 (P2002-522883)
 (86) (22) 出願日 平成13年3月9日 (2001.3.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年3月11日 (2002.3.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2001/000368
 (87) 国際公開番号 WO2002/017909
 (87) 国際公開日 平成14年3月7日 (2002.3.7)
 (31) 優先権主張番号 2000/46916
 (32) 優先日 平成12年8月14日 (2000.8.14)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(71) 出願人 502132106
 コリア インスティテュート オブ オリ
 エンタル メダシン
 大韓民国 135-765 ソウル カン
 グナムグ チェオングダムドング 129
 -11 セシンビル4階
 (74) 代理人 100087826
 弁理士 八木 秀人
 (74) 代理人 100110526
 弁理士 清水 修
 (72) 発明者 金 貞淑
 大韓民国 ソウル特別市 江南区 清潭洞
 129-11 青岩ビル4階

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クエルセチン誘導体を有効成分として含有する骨粗鬆症治療剤

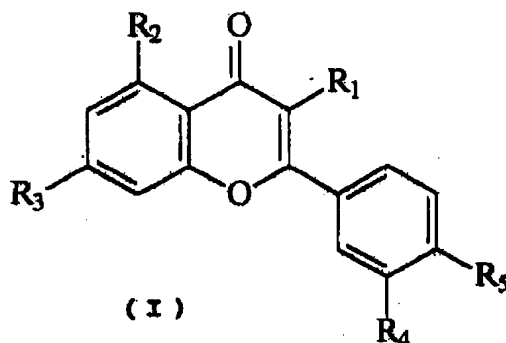
(57) 【要約】

本発明は骨芽細胞 (osteoblast) の細胞増殖促進効果及び破骨細胞 (osteoclast) の細胞増殖抑制効果に優れた、下記一般式 (I) で表されるクエルセチン誘導体を有効成分として含有する骨粗鬆症治療剤に関する。本発明のクエルセチン誘導体は、従来の骨粗鬆症治療剤に比べて骨芽細胞の細胞増殖促進効果及び破骨細胞の細胞増殖抑制効果に優れ、体内ホルモンの変化を大きく誘発せず、海綿骨の面積増加効果がさらに高く現れるのみならず、副作用がなく造血機能や免疫系に影響を与えない安全な薬物として確認され、骨粗鬆症治療剤または予防剤として幅広く活用されうる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記一般式 (I) で表されるクエルセチン誘導体を有効成分として含有し、薬学的に許容される担体を含む骨粗鬆症治療剤：



式中、

R₁ はゲンチオトリオース (gentiotriose)、グルコピラノース (glucopyranose)、0-アラビノフラノース (0-arabinofuranose)、0-ジグルコピラノース (0-diglucopyranose)、0-ガラクトピラノース (0-galactopyranose)、0-ガラクトシド-ガレート (0-galactoside-gallate)、0-ゲンチオビオース (0-gentiobiose)、0-グルコピラノース (0-glucopyranose)、0-グルクロニド (0-glucuronide)、0-ネオヘスペリドス (0-neohesperidose)、0-ラムノピラノース (0-rhamnopyranose)、0-ルチノース (0-rutinoside)、0-ソフォロース (0-sophorose)、0-キシロピラノース (0-xylopyranose)、OCH₃、OH、ラムノゲンチオビオース (rhamnogentiobiose)、ラムノグルコース (rhamnoglucose) または硫酸 (sulfate) であり；R₂ はOHまたは0-グルコピラノース (0-glucopyranose) であり；R₃ はOCH₃、OH、0-グルコピラノース (0-glucopyranose)、0-グルクロノピラノース (0-glucuronopyranose) またはグルコピラノース (glucopyranose) であり；

R₄ はOCH₃ またはOHであり；及び

R₅ はOCH₃、OH、0-グルコピラノース (0-glucopyranose) または0-グルコース (0-glucose) である。

【請求項2】

クエルセチンの誘導体は、前記一般式 (I) において、R₂ ないし R₅ が-OHであるクエルセチン (quercetin)、アビキュラロシド (avicularoside)、キアザベリン (guiajaverin)、ハイパーロシド (hyperoside)、イソクエルシトリン (isoquercitrin)、マルチノシドA (multinoside A)、マルチノシドAアセテート (multinoside A acetate)、クエルシトリン (quercitrin)、ルチン (rutin)、クエルセチン-3-O-(2"-O-β-D-グルコピラノシル)-α-L-ラムノピラノシド (quercetin-3-O-(2"-O-β-D-glucopyranosyl)-α-L-rhamnopyranoside)、クエルセチン-3-O-(6"-O-ガラロイル)-グルコピラノシド (quercetin-3-O-(6"-O-galloyl)-glucopyranoside)、クエルセチン-3-O-(6'-O-p-クマロイル-β-D-グルコピラノシル)-(1-2)-α-L-ラムノピラノシド (quercetin-3-O-(6'-O-p-coumaroyl-β-D-glucopyranosyl)-(1-2

10

20

30

40

50

)- α -L-rhamnopyranoside))、クエルセチン-3-O-D-グル
 コピラノシル-(1-6)- β -D-グルコピラノシル-(1-4)- α -L-ラムノピ
 ラノシド(queracetin-3-O-D-glucopyranosyl-(1-6)
)- β -D-glucopyranosyl-(1-4)- α -L-rhamnopyr
 anoside)、クエルセチン-3-O-[2"-0-6'"-0-p-(7'"-0
 - β -D-グルコピラノシル)クマロイル- β -D-グルコピラノシル]- α -L-ラム
 ノピラノシド(queracetin-3-O-[2"-0-6'"-0-p-(7'"-0
 0- β -D-glucopyranosyl)coumaroyl- β -D-gluc
 o
 pyranosyl]- α -L-rhamnopyranoside)、クエルセチン-
 3-O-[6'"-p-クマロイル- β -D-グルコピラノシル- β -(1-4)-ラム
 ノピラノシド](queracetin-3-O-[6'"-p-coumaroyl- β
 -D-glucopyranosyl- β -(1-4)-rhamnopyranosi
 de))、クエルセチン-3-O-[α -L-ラムノピラノシド(1-2)- α -L-ラ
 ムノピラノシド-(1-6)- β -D-グルコピラノシド](queracetin-3-
 0-[α -L-rhamnopyranosyl(1-2)- α -L-rhamnopy
 ranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranoside))、クエルセ
 チン-3-O-[α -ラムノピラノシド(1-4)- α -L-ラムノピラノシド(1-6)
 β -D-ガラクトピラノシド](queracetin-3-O-[α -rhamnopy
 ranosyl(1-4)- α -L-rhamnopyranosyl(1-6)- β -D-
 galactopyranoside))、クエルセチン-3-O-[α -ラムノピラノ
 シド-(1-2)]-[β -グルコピラノシル-(1-6)]- β -D-ガラクトピラノ
 シド(queracetin-3-O-[α -rhamnopyranosyl-(1-2
)]-[β -glucopyranosyl-(1-6)]- β -D-galactop
 yranoside)、クエルセチン-3-O-[α -ラムノピラノシド-(1-4)-
 α -ラムノピラノシド-(1-6)- β -ガラクトピラノシド](queracetin-
 3-O-[α -rhamnopyranosyl-(1-4)- α -rhamnopyr
 anosyl-(1-6)- β -galactopyranoside))、クエルセチ
 ン-3-O- α -L-ラムノピラノシド-(1-2)- β -D-ガラクトピラノシド(q
 ueracetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- β
 -D-galactopyranoside)、クエルセチン-3-O- β -D-ジグル
 コピラノシド(queracetin-3-O- β -D-diglucopyranosi
 de)、クエルセチン-3-O- β -D-ガラクトシド-2"-ガレート(querce
 tin-3-O- β -D-galactoside-2"-gallate)、クエルセ
 チン-3-O- β -D-グルコピラノシド-(1-6)- β -D-ガラクトピラノシド(
 queracetin-3-O- β -D-glucopyranoside-(1-6)-
 β -D-galactopyranoside)、クエルセチン-3-O- β -D-グル
 コピラノシル-(1-3)- α -L-ラムノピラノシド-(1-6)- β -D-ガラクト
 ピラノシド(queracetin-3-O- β -D-glucopyranosyl-(
 1-3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-6)- β -D-galac
 topyranoside)、クエルセチン-3-O- β -D-グルクロナイド(que
 rcetin-3-O- β -D-glucuronide)、クエルセチン-3-O- β
 -D-キシロピラノシド(queracetin-3-O- β -D-xylopyrano
 side)、クエルセチン-3-O-ジグルコピラノシド(queracetin-3-O
 -diglucospyranoside)、クエルセチン-3-O-ゲンチオビオシド
 (queracetin-3-O-gentiobioside)、クエルセチン-3-O
 -グルコピラノシルガラクトピラノシド(queracetin-3-O-glucopy
 ranosylgalactopyranoside)、クエルセチン-3-O-ネオヘ
 スペリドシド(queracetin-3-O-neohesperidoside)、ク
 エルセチン-3-ゲンチオトリオシド(queracetin-3-gentiotrio
 side)、クエルセチン-3-メチルエーテル(queracetin-3-methy

10

20

30

40

50

l ether)、クエルセチン-3-ラムノゲンチオビオシド(quer cet in-3-r hamn o gent i o bi o si de)、クエルセチン-3-ラムノグルコシド(quer cet in-3-r hamn o gl u co si de)またはクエルセチン-3-硫酸塩(quer cet in-3-s ul fa te)であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項3】

クエルセチンの誘導体は、前記一般式(I)において、 R_1 が-OHであり、 R_2 ないし R_5 のうち三つの機能グループがOHである、イソラムネチン(is or ham ne ti n)、クエルシメリトリン(quer ci me ri tri n)、ラムネチン(r ham ne ti n)、クエルセチン-5-O- β -D-グルコピラノシド(quer cet in-5-O- β -D-gl u co py ra no si de)、クエルセチン-7-O- β -D-グルクロノピラノシド(quer cet in-7-O- β -D-gl u cu ro no py ra no si de)またはスピレオシド(sp i re a o si de)であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項4】

クエルセチンの誘導体は、前記一般式(I)において、 R_1 ないし R_5 のうち三つの機能グループがOHである、ラムナジン(r ham na zi n)、クエルセチン-3'、4'-ジメチルエーテル(quer cet in-3'、4'-di-me th yl et he r)、クエルセチン-3、3'-ジメチルエーテル(quer cet in-3、3'-di-me th yl et he r)、クエルセチン-3、7'-ジメチルエーテル(quer cet in-3、7'-di-me th yl et he r)、クエルセチン-3-O-[2"-O-(6'"-O-p-クマロイル)- β -D-グルコピラノシル]- α -L-ラムノピラノシド-7-O- β -D-グルコピラノシド(quer cet in-3-O-[2"-O-(6'"-O-p-co u ma ro yl)- β -D-gl u co py ra no syl]- α -L-r ham no py ra no syl-7-O- β -D-gl u co py ra no si de)、クエルセチン-3-O-[2"-O-6'"-O-p-(7'"-O- β -D-グルコピラノシル)クマロイル- β -D-グルコピラノシル]- α -L-ラムノピラノシド-7-O- β -D-グルコピラノシド(quer cet in-3-O-[2"-O-6'"-O-p-(7'"-O- β -D-gl u co py ra no syl) cou ma ro yl- β -D-gl u co py ra no syl]- α -L-r ham no py ra no si de-7-O- β -D-gl u co py ra no si de)、クエルセチン-3-O-ルチノシド-7-O- β -D-グルコピラノシド(quer cet in-3-O-r u ti no si de-7-O- β -D-gl u co py ra no si de)、クエルセチン-3-O- α -L-アラビノピラノシル-7-O- β -D-グルコピラノシド(quer cet in-3-O- α -L-a ra bi no py ra no syl-7-O- β -D-gl u co py ra no si de)、クエルセチン-7-O- β -D-グルコピラノシド-3-O-ソフォロシド(quer cet in-7-O- β -D-gl u co py ra no si de-3-O-so ph o ro si de)、クエルセチン-3-O-ガラクトピラノシル-7-O-ジグルコピラノシド(quer cet in-3-O-ga lac to py ra no syl-7-O-di gl u co py ra no si de)、クエルセチン-3-O-グルコピラノシル-7-ジグルコピラノシド(quer cet in-3-O-gl u co py ra no syl-7-di gl u co py ra no si de)、クエルセチン-3、7-ジグルコピラノシド(quer cet in-3、7-di gl u co py ra no si de)、クエルセチン-3-ゲンチオビオシル-7-グルコピラノシド(quer cet in-3-gent i o bi o syl-7-gl u co py ra no si de)またはクエルセチン-3、4'-ジ-O- β -D-グルコピラノシド(quer cet in-3、4'-di-O- β -D-gl u co py ra no si de)であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項5】

クエルセチンの誘導体は、クエルセチン-3、4'、7-トリメチルエーテル(quer 50

cet in-3、4'、7-trimethyl ether) またはクエルセチン-3、3'、4'、7-tetramethyl ether) であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項6】

薬学的に許容される担体は、ポリビニールピロリドン及びヒドロキシプロピルセルロースで構成されたグループから選ばれる1種の結合剤であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項7】

薬学的に許容される担体は、カルボキシメチルセルロースカルシウム及び澱粉グリコール酸ナトリウムよりなるグループから選ばれる1種の滑沢剤であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項8】

薬学的に許容される担体は、トウモロコシ澱粉、乳糖、大豆油、結晶セルロース及びマンニトールで構成されたグループから選ばれる1種の稀釈剤であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項9】

薬学的に許容される担体は、ステアリン酸マグネシウム及びタルクよりなるグループから選ばれる1種の滑沢剤であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項10】

薬学的に許容される担体は白糖、果糖、ソルビトール及びアスパルタムよりなるグループから選ばれる1種の甘味剤であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項11】

薬学的に許容される担体はカルボキシメチルセルロースナトリウム、 α または β シクロデキストリン、ビタミンC、クエン酸及び白炭より構成されたグループから選ばれる1種の安定剤であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項12】

薬学的に許容される担体はパラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸プロピル及び安息香酸ナトリウムで構成されたグループから選ばれる1種の保存料であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項13】

薬学的に許容される担体はエチルバニリン、マスキングフラボール、メントルフラボノ及びハーブ香で構成されたグループから選ばれる1種の香料であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項14】

治療剤は錠剤、カプセル剤、軟質カプセル剤、液剤、軟膏剤、丸剤、散剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、坐剤及び注射剤とから構成されたグループから選ばれる1種の経口投与製剤、または非経口投与製剤であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

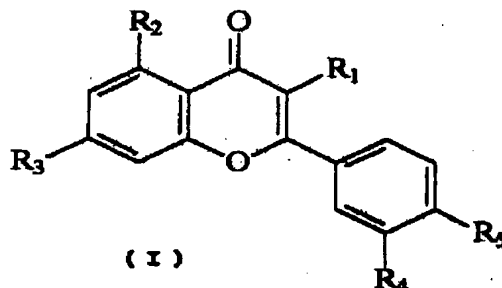
【請求項15】

カルシウムまたはビタミンD₃をさらに含むことを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明はクエルセチン(querce tin)誘導体を有効成分として含有する骨粗鬆症治療剤に係り、さらに具体的に骨芽細胞(osteoblast)の細胞増殖促進効果及び破骨細胞(osteoclast)の細胞増殖抑制効果に優れた、下記一般式(I)で表されるクエルセチン誘導体を有効成分として含有する骨粗鬆症治療剤に関する。



背景技術

骨粗鬆症 (osteoporosis) は骨組織の脱灰により骨の緻密質が薄くなり、よって骨髓腔が広まる疾患であって、病勢が進むことにより骨が弱まるため、軽い衝撃にも骨折しやすくなる。骨量は遺伝的要因、栄養摂取、ホルモンの変化、運動及び生活習慣の違いなど色々の要因により影響を受ける。老齢、運動不足、低体重、喫煙、低カルシウム食餌、閉経、卵巣摘出などにより骨粗鬆症が誘発されると知られている。特に、女性の場合30歳以降から骨減少が持続的に進み、閉経期に至るとエストロゲン (estrogen) 濃度が急激に減少してIL-7 (interleukin-7) によりBリンパ球が生成されるものと類似にB-リンパ球 (B-lymphocyte) が多量生成されることにより骨髓 (bone marrow) にB細胞の前駆体 (pre-B cell) が蓄積され、よってIL-6の量が増えて破骨細胞の活性を増加させるため、結局骨量が減るようになる。このような骨粗鬆症は程度に差があるが、老年層、特に閉経期以後の女性にとっては症候は多様だが、避けられない症状なので、人口の高齢化に伴う骨粗鬆症を予防及び治療するために全世界的に各研究機関と製薬会社では骨疾患治療剤の開発に多くの投資がなされている。

現在骨粗鬆症治療剤として使用されている物質としては、エストロゲン (estrogen)、アンドロゲンアナボリックステロイド (androgenic anabolic steroid)、カルシウム製剤、燐酸塩、弗素製剤、イプリフラボン (ipriflavone)、ビタミンD₃ などがある。かつ、最近では1995年アメリカのマーク社 (Merck Co.) でアミノビスフォスフォネート (aminobisphosphonate) を、1997年アメリカのEli Lilly Co. で選択的なエストロゲン受容体調節器 (selective estrogen receptor modulator, SERM) として働くラロキシフェン (raloxifene) を骨粗鬆症に対する新薬として開発したことがある。

前述した骨粗鬆症治療剤はほぼ癌、胆石、血栓症などの副作用が現れるエストロゲン系の物質であることだと知られている。しかし、骨粗鬆症は薬物の長期投与が必須なので、薬物を長期投与する時にはエストロゲンを代替できるほど優れた薬効を有する新たな物質の開発が要求されている。

エストロゲン代替物質として大豆のイソフラボン (soybean isoflavone) のような植物エストロゲン (phytoestrogen) が報告されている。植物エストロゲンは1946年に最初に報告されたが、'クローバ病 (clover disease)' [赤いクローバ種 (red clover, *Trifolium subterraneum* var. *Dwalganup*) に属する植物を食べた羊の不妊率が30%以上増加され、'クローバ病' と命名される] の原因がこの植物に含有された成分のうちエストロゲンに似ているイソフラボノイド (isoflavonoid) であることを明かし、植物から得られたこのような化合物を '植物エストロゲン' と命名した。その後、ダイゼイン (daidzein)、ゲニステイン (genistein)、フォルムオノネチン (formononetin)、ビオカニンA (biochanin A) などのイソフラボン (isoflavone) 類化合物、クメストロール (coumestrol) などのクメスタン (coumestan) 類化合物、エンテロラクトン (enterolactone) などのリグナン (lignan) 系化合物及びエンテロジオール (

10

20

30

40

50

enterodiol) などのフェノール (phenol) 系化合物などが植物エストロゼンとして報告された。これら植物エストロゼンはほぼアグリコン (aglycone)、6'-O-アセチルグルコシド (6'-O-acetylglucoside) または、6'-O-マロニルグルコシド (6'-O-malonylglucoside) などの形態に在し、ダイゼインとゲニステインは7-O-グルコシド (7-O-glucoside) の形態に存する。

前記化合物のうち糖化合物は腸内バクテリアの β -グルコシダーゼ (β -glucosidase) または胃酸により加水分解され、結局フリー (free) イソフラボンであるアグリコンの形態に吸収されることと知られている。今までの研究結果によれば、前記植物エストロゼンは動物のエストロゼンと類似した作用を示すことと知られている。すなわち、エストロゼン受容体に結合して乳癌細胞の成長を抑え閉経期以後に現れる心血管系疾患 (cardiovascular disease) 及びその他の症状の治療にエストロゼンを代替して使用されうることが報告された。しかし、前記植物エストロゼンによる骨粗鬆症予防及び治療効果が微弱であり、天然物から分離精製時高コストになり、骨粗鬆症予防及び治療に幅広く活用できない現状である。

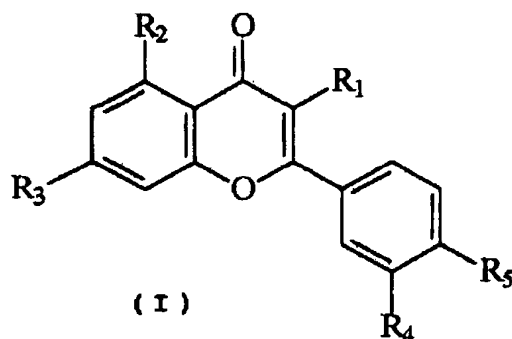
従って、副作用がなく、骨粗鬆症予防及び治療効果がよく、低コストの代替物質を開発すべき必要性が絶え間なく台頭された。

発明の開示

これに本発明者らは副作用がなく、骨粗鬆症予防及び治療効果が良く、生産コストが低廉な代替物質を開発するために鋭意工夫した結果、化学的に合成可能なクエルセチン誘導体が骨芽細胞の細胞増殖を促進し破骨細胞の細胞増殖を抑える活性が優秀でのみならず、体内の臓器組織に副作用を示さなくて安全性を有するところ、クエルセチン誘導体を骨粗鬆症治療剤の有効成分として使用できることを確認し、本発明を完成するに至った。

つまり、本発明の目的はクエルセチン (quercetin) 及びその誘導体を有効成分として含有する骨粗鬆症治療剤を提供するところにある。

本発明は下記一般式 (I) で表されるクエルセチン誘導体を有効成分として含有し、薬学的に許容される担体を含む骨粗鬆症治療剤を提供する：



式中、

R₁ はゲンチオトリオース (gentiotriose)、グルコピラノース (glucopyranose)、O-アラビノフラノース (O-arabinofuranose)、O-ジグルコピラノース (O-diglucopyranose)、O-ガラクトピラノース (O-galactopyranose)、O-ガラクトシド-ガレート (O-galactoside-gallate)、O-ゲンチオビオース (O-gentiobiose)、O-グルコピラノース (O-glucopyranose)、O-グルクロニド (O-glucuronide)、O-ネオヘスペリドス (O-neohesperidose)、O-ラムノピラノース (O-rhamnopyranose)、O-ルチノース (O-rutinose)、O-ソフォロース (O-sophorose)、O-キシロピラノース (O-xylopyranose)、OCH₃、OH、ラムノゲンチオビオース (rhamnogentiobiose)、ラムノグルコース (rhamno

glucose) または硫黄 (sulfate) であり;

R_2 は OH または O-グルコピラノース (O-glucopyranose) であり;

R_3 は OCH_3 、OH、O-グルコピラノース (O-glucopyranose)、O-グルクロピラノース (O-glucuronopyranose) またはグルコピラノース (glucopyranose) であり;

R_4 は OCH_3 または OH であり; 及び、

R_5 は OCH_3 、OH、O-グルコピラノース (O-glucopyranose) または O-グルコース (O-glucose) である。

前記一般式 (I) のクエルセチン誘導体のうち一般によく知られている化合物は次のように分類できる: (i) R_2 ないし R_5 が -OH であり、 R_1 により相違になる誘導体グループであって、 R_1 が OH であるクエルセチン (quercetin)、 R_1 が O- α -L-アラビノフラノース (arabinofuranose) であるアビキュラロシド (avicularoside)、 R_1 が O-アラビノピラノース (O-arabinopyranose) であるキアザベリン (guiajaverin)、 R_1 が O- β -D-ガラクトピラノース (O- β -D-galactopyranose) であるハイパーロシド (hyperoside)、 R_1 が O- β -D-ガラクトピラノース (O- β -D-galactopyranose) であるイソハイパーロシド (isohyperoside)、 R_1 が O-グルコピラノース (O-glucopyranose) であるイソクエルシトリン (isoquercitrin)、 R_1 が O-[β -D-グルコピラノシル-(1-4)- α -L-ラムノピラノース] (O-[β -D-Glucopyranosyl-(1-4)- α -L-rhamnopyranose]) であるマルチノシド A (multinoside A)、 R_1 が (6-O-アセチル)- β -D-グルコピラノシル-(1-4)- α -L-ラムノピラノース ((6-O-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-(1-4)- α -L-rhamnopyranose) であるマルチノシド A アセテート (multinoside A acetate)、 R_1 が O- α -L-ラムノピラノース (O- α -L-rhamnopyranose) であるクエルシトリン (quercitrin)、 R_1 が O- β -D-ルチノース (O- β -D-rutinoside) であるルチン (rutin)、 R_1 が O-(2"-O- β -D-グルコピラノシル)- α -L-ラムノピラノース (O-(2"-O- β -D-glucopyranosyl)- α -L-rhamnopyranose) であるクエルセチン-3-O-(2"-O- β -D-グルコピラノシル)- α -L-ラムノピラノシド (quercetin-3-O-(2"-O- β -D-glucopyranosyl)- α -L-rhamnopyranoside)、 R_1 が O-(6"-O-ガライル)-グルコピラノース (O-(6"-O-galloyl)-glucopyranose) であるクエルセチン-3-O-(6"-O-ガライル)-グルコピラノシド (quercetin-3-O-(6"-O-galloyl)-glucopyranoside)、 R_1 が O-(6'-O-p-クマロイル)- β -D-グルコピラノシル-(1-2)- α -L-ラムノピラノース (O-(6'-O-p-coumaroyl)- β -D-glucopyranosyl-(1-2)- α -L-rhamnopyranose) であるクエルセチン-3-O-(6'-O-p-クマロイル)- β -D-グルコピラノシル-(1-2)- α -L-ラムノピラノシド (quercetin-3-O-(6'-O-p-coumaroyl)- β -D-glucopyranosyl-(1-2)- α -L-rhamnopyranoside)、 R_1 が O-D-グルコピラノシル-(1-6)- β -D-グルコピラノシル-(1-4)- α -L-ラムノピラノース (O-D-glucopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranosyl-(1-4)- α -L-rhamnopyranose) であるクエルセチン-3-O-D-グルコピラノシル-(1-6)- β -D-グルコピラノシル-(1-4)- α -L-ラムノピラノシド (quercetin-3-O-D-glucopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranosyl-(1-4)- α -L-rhamnopyranoside)、 R_1 が O-[2"-O-6'-O-p-(7"-O- β -D-グルコピラ

10

20

30

40

50

ノシル) クマロイル-β-D-グルコピラノシル]-α-L-ラムノピラノース (0-[2"-0-6'"-0-p-(7'"-0-β-D-glucopyranosyl)] coumaroyl-β-D-glucopyranosyl]-α-L-rhamnopyranose) であるクエルセチン-3-0-[2"-0-6'"-0-p-(7'"-0-β-D-グルコピラノシル) クマロイル-β-D-グルコピラノシル]-α-L-ラムノピラノシド (quercetin-3-0-[2"-0-6'"-0-p-(7'"-0-β-D-glucopyranosyl)] coumaroyl-β-D-glucopyranosyl]-α-L-rhamnopyranoside)、R₁ が 0-[6'"-p-クマロイル-β-D-グルコピラノシル-β-(1-4)-ラムノピラノース] (0-[6'"-p-coumaroyl-β-D-glucopyranosyl-β-(1-4)-rhamnopyranose]) であるクエルセチン-3-0-[6'"-p-クマロイル-β-D-グルコピラノシル-β-(1-4)-ラムノピラノシド] (quercetin-3-0-[6'"-p-coumaroyl-β-D-glucopyranosyl-β-(1-4)-rhamnopyranoside])、R₁ が 0-[α-L-ラムノピラノシド (1-2)-α-L-ラムノピラノシド-(1-6)-β-D-グルコピラノース] (0-[α-L-rhamnopyranosyl (1-2)-α-L-rhamnopyranosyl-(1-6)-β-D-glucopyranose]) であるクエルセチン-3-0-[α-L-ラムノピラノシド (1-2)-α-L-ラムノピラノシド-(1-6)-β-D-グルコピラノシド] (quercetin-3-0-[α-L-rhamnopyranosyl (1-2)-α-L-rhamnopyranosyl-(1-6)-β-D-glucopyranoside])、R₁ が 0-[α-ラムノピラノシド (1-4) α-L-ラムノピラノシド (1-6) β-D-ガラクトピラノース] (0-[α-rhamnopyranosyl (1-4) α-L-rhamnopyranosyl (1-6) β-D-galactopyranose]) であるクエルセチン-3-0-[α-ラムノピラノシド (1-4) α-L-ラムノピラノシド (1-6) β-D-ガラクトピラノシド] (quercetin-3-0-[α-rhamnopyranosyl (1-4) α-L-rhamnopyranosyl (1-6) β-D-galactopyranoside])、R₁ が 0-[α-ラムノピラノシド-(1-2)]-[β-グルコピラノシル-(1-6)]-β-D-ガラクトピラノース (0-[α-rhamnopyranosyl-(1-2)]-[β-glucopyranosyl-(1-6)]-β-D-galactopyranose) であるクエルセチン-3-0-[α-ラムノピラノシド-(1-2)]-[β-グルコピラノシル-(1-6)]-β-D-ガラクトピラノシド (quercetin-3-0-[α-rhamnopyranosyl-(1-2)]-[β-glucopyranosyl-(1-6)]-β-D-galactopyranoside)、R₁ が 0-[α-ラムノピラノシド-(1-4)-α-ラムノピラノシド-(1-6)-β-ガラクトピラノース] (0-[α-rhamnopyranosyl-(1-4)-α-rhamnopyranosyl-(1-6)-β-galactopyranose]) であるクエルセチン-3-0-[α-ラムノピラノシド-(1-4)-α-ラムノピラノシド-(1-6)-β-ガラクトピラノシド] (quercetin-3-0-[α-rhamnopyranosyl-(1-4)-α-rhamnopyranosyl-(1-6)-β-galactopyranoside])、R₁ が 0-α-L-ラムノピラノシド-(1-2)-β-D-ガラクトピラノース (0-α-L-rhamnopyranosyl-(1-2)-β-D-galactopyranose) であるクエルセチン-3-0-α-L-ラムノピラノシド-(1-2)-β-D-ガラクトピラノシド (quercetin-3-0-α-L-rhamnopyranosyl-(1-2)-β-D-galactopyranoside)、R₁ が 0-β-D-ジグルコピラノース (0-β-D-diglucopyranose) であるクエルセチン-3-0-β-D-ジグルコピラノシド (quercetin-3-0-β-D-diglucopyranoside)、R₁ が 0-β-D-ガラクトピラノシド-2"-ガラクト (0-

10

20

30

40

50

β -D-galactoside-2"-galactate)であるクエルセチン-3-O-
 β -D-ガラクトシド-2"-ガレート(querce tin-3-O- β -D-ga-
 lactoside-2"-galactate)、 R_1 がO- β -D-グルコピラノシド-
 (1-6)- β -D-ガラクトピラノース(O- β -D-glucopyranoside-
 (1-6)- β -D-galactopyranose)であるクエルセチン-3-
 O- β -D-グルコピラノシド- (1-6)- β -D-ガラクトピラノシド(querce
 tin-3-O- β -D-glucopyranoside-(1-6)- β -D-g
 alactopyranoside)、 R_1 がO- β -D-グルコピラノシル- (1-3)
)- α -L-ラムノピラノシド- (1-6)- β -D-ガラクトピラノース(O- β -D
 -glucopyranosyl-(1-3)- α -L-rhamnopyranosy 10
 l-(1-6)- β -D-galactopyranose)であるクエルセチン-3-
 O- β -D-グルコピラノシル- (1-3)- α -L-ラムノピラノシド- (1-6)-
 β -D-ガラクトピラノシド(querce tin-3-O- β -D-glucopyr
 anosyl-(1-3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-6)- β
 -D-galactopyranoside)、 R_1 がO- β -D-グルクロナイド(O
 - β -D-glucuronide)であるクエルセチン-3-O- β -D-グルクロナ
 イド(querce tin-3-O- β -D-glucuronide)、 R_1 がO- β -
 D-キシロピラノース(O- β -D-xylopyranose)であるクエルセチン
 -3-O- β -D-キシロピラノシド(querce tin-3-O- β -D-xyl o
 pyranoside)、 R_1 がO-ジグルコースピラノース(O-diglucosp 20
 yranose)であるクエルセチン-3-O-ジグルコピラノシド(querce ti
 n-3-O-diglucospyranoside)、 R_1 がO-ゲンチオビオース(O
 -gentiobiose)であるクエルセチン-3-O-ゲンチオビオシド(que
 rcet in-3-O-gentiobioside)、 R_1 がO-グルコピラノシルガ
 ラクトピラノース(O-glucopyranosylgalactopyranose
)であるクエルセチン-3-O-グルコピラノシルガラクトピラノシド(querce t
 in-3-O-glucopyranosylgalactopyranoside)、
 R_1 がO-ネオヘスペリドス(O-neohesperidose)であるクエルセチン
 -3-O-ネオヘスペリドシドシド(querce tin-3-O-neohespe
 ridoside)、 R_1 がO-ソフォロース(O-sophorose)であるクエル 30
 セチン-3-O-ソフォロシド(querce tin-3-O-sophoroside
)、 R_1 がゲンチオトリオース(gentiotriose)であるクエルセチン-3-
 ゲンチオトリオシド(querce tin-3-gentiotrioside)、 R_1
 がOCH₃であるクエルセチン-3-メチルエーテル(querce tin-3-met
 hyl ether)、 R_1 がラムノゲンチオビオース(rhamnogentiobi
 ose)であるクエルセチン-3-ラムノゲンチオビオシド(querce tin-3-
 rhamnogentiobioside)、 R_1 がラムノグルコース(rhamnog
 lucose)であるクエルセチン-3-ラムノグルコシド(querce tin-3-
 rhamnoglucoside)、 R_1 が硫黄であるクエルセチン-3-硫酸塩(qu
 erce tin-3-sulfate)などが含まれる：

(ii) R_1 がOHであり、 R_2 ないし R_5 のうち3個の機能グループがOHであり、残
 り1個の機能グループにより相違になる誘導体グループであって、 R_4 がOCH₃である
 イソラムネチン(isorhamnetin)、 R_3 がO- β -D-クルコピラノス(O
 - β -D-glucopyranose)であるクエルシメリトリン(querce ime
 ritrin)、 R_3 がOCH₃であるラムネチン(rhamnetin)、 R_2 がO-
 β -D-グルコピラノース(O- β -D-glucopyranose)であるクエルセ
 チン-5-O- β -D-グルコピラノシド(querce tin-5-O- β -D-gl
 ucopyranoside)、 R_3 がO- β -D-クルクロノピラノース(O- β -D
 -glucuronopyranose)であるクエルセチン-7-O- β -D-グルク
 ロノピラノシド(querce tin-7-O- β -D-glucuronopyran 50

oside)、 R_5 が O-グルコース (O-glucose) であるスピレオシド (spireaoside) などが含まれる; (iii) R_1 ないし R_5 のうち 3 個の機能グループが OH であり、残り 2 個の機能グループにより相違になる誘導体グループであって、 R_3 と R_4 が OCH_3 であるラムナジン (rhamnazin)、 R_4 と R_5 が OCH_3 であるクエルセチン-3'、4'-ジメチルエーテル (quercetin-3', 4'-dimethyl ether)、 R_1 と R_4 が OCH_3 であるクエルセチン-3、3'-ジメチルエーテル (quercetin-3, 3'-dimethyl ether)、 R_1 と R_3 が OCH_3 であるクエルセチン-3、7'-ジメチルエーテル (quercetin-3, 7'-dimethyl ether)、 R_1 が O-[2"-O-(6'-"-O-p-クマロイル)- β -D-グルコピラノシル]- α -L-ラムノピラノース (O-[2"-O-(6'-"-O-p-coumaroyl)- β -D-glucopyranosyl]- α -L-rhamnopyranose) であり、 R_3 が O- β -D-グルコピラノース (O- β -D-glucopyranose) であるクエルセチン-3-O-[2"-O-(6'-"-O-p-クマロイル)- β -D-グルコピラノシル]- α -L-ラムノピラノシド-7-O- β -D-グルコピラノシド (quercetin-3-O-[2"-O-(6'-"-O-p-coumaroyl)- β -D-glucopyranosyl]- α -L-rhamnopyranosyl-7-O- β -D-glucopyranoside)、 R_1 が O-[2"-O-6'-"-O-p-(7'-"-O- β -D-グルコピラノシル)クマロイル- β -D-グルコピラノシル]- α -L-ラムノピラノース (O-[2"-O-6'-"-O-p-(7'-"-O- β -D-glucopyranosyl) coumaroyl- β -D-glucopyranosyl]- α -L-rhamnopyranose) であり、 R_3 が O- β -D-グルコピラノース (O- β -D-glucopyranose) であるクエルセチン-3-O-[2"-O-6'-"-O-p-(7'-"-O- β -D-グルコピラノシル)クマロイル- β -D-グルコピラノシル]- α -L-ラムノピラノシド-7-O- β -D-グルコピラノシド (quercetin-3-O-[2"-O-6'-"-O-p-(7'-"-O- β -D-glucopyranosyl) coumaroyl- β -D-glucopyranosyl]- α -L-rhamnopyranoside-7-O- β -D-glucopyranoside)、 R_1 が O-ルチノース (O-rutinose) であり、 R_3 が O- β -D-グルコピラノース (O- β -D-glucopyranose) であるクエルセチン-3-O-ルチノシド-7-O- β -D-グルコピラノシド (quercetin-3-O-rutinoside-7-O- β -D-glucopyranoside)、 R_1 が O- α -L-アラビノピラノシル (O- α -L-arabinopyranosyl) であり、 R_3 が O- β -D-グルコピラノース (O- β -D-glucopyranose) であるクエルセチン-3-O- α -L-アラビノピラノシル-7-O- β -D-グルコピラノシド (quercetin-3-O- α -L-arabinopyranosyl-7-O- β -D-glucopyranoside)、 R_1 が O-ソホロース (O-sophorose) であり、 R_3 が O- β -D-グルコピラノース (O- β -D-glucopyranose) であるクエルセチン-7-O- β -D-グルコピラノシド-3-O-ソフォロシド (quercetin-7-O- β -D-glucopyranoside-3-O-sophoroside)、 R_1 が O-ガラクトピラノース (O-galactopyranose) であり、 R_3 が O-グルコピラノース (O-glucopyranose) であるクエルセチン-3-O-ガラクトピラノシル-7-O-ジグルコピラノシド (quercetin-3-O-galactopyranosyl-7-O-diglucopyranoside)、 R_1 が O-グルコピラノース (O-glucopyranose) であり、 R_3 が O-グルコピラノース (O-glucopyranose) であるクエルセチン-3-O-グルコピラノシル-7-ジグルコピラノシド (quercetin-3-O-glucopyranosyl-7-diglucopyranoside)、 R_1 がグルコピラノース (glucopyranose) であり、 R_3 がグルコピラノース (glucopyranose) であるクエルセチン-3、7-ジ

グルコピラノシド (quercetin-3, 7-diglucopyranoside)、 R_1 がゲンチオビオース (gentiobiose) であり、 R_3 がグルコピラノース (glucopyranose) であるクエルセチン-3-ゲンチオビオシル-7-グルコピラノシド (quercetin-3-gentiobiosyl-7-glucopyranoside)、 R_1 と R_5 が 0- β -D-グルコピラノース (0- β -D-glucopyranose) であるクエルセチン-3, 4'-ジ-0- β -D-グルコピラノシド (quercetin-3, 4'-di-0- β -D-glucopyranoside) などが含まれる；(iv) その他、3個以上の機能グループが変化された誘導体グループであって、 R_1 、 R_3 及び R_5 が OCH_3 であり、 R_2 及び R_4 が OH であるクエルセチン-3, 4', 7-トリメチルエーテル (quercetin-3, 4', 7-trimethyl ether)、 R_1 、 R_3 、 R_4 及び R_5 が OCH_3 であり、 R_2 が OH であるクエルセチン-3, 3', 4', 7-テトラメチルエーテル (quercetin-3, 3', 4', 7-tetramethyl ether) などが含まれる。

前記一般式 (I) において R_1 ないし R_5 が全て OH であるクエルセチン (quercetin) は自然界に存する 4000 余種の植物から得られるフェノール系化合物 (phenolic compound) であって、 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ の分子式と 302.33 g/mole の分子量を有する植物エストロゼンの一種で、化学構造において、大きい共鳴構造を有しており、1936年に最初にその構造が明らかになった後、ビタミンP (vitamin P) とも知られている。一般に、クエルセチンは通常に糖類が β -結合した配糖体であるルチン (rutin) であって、クローバ花、ブタクサ花粉、多様な植物の皮と筋だけではなく、玉ねぎ、ケール、ブロッコリ、レタース、トマト、りんごなどに幅広く分布されている。クエルセチンの作用に対する研究結果、今までは主に毛細管壁の伸縮性 (capillary wall integrity) 及び毛細管抵抗性 (capillary resistance) 維持に大事な役割を果たすのみならず (参照: Gabor et al., Progress in Clinical and Biological Research, 280:1-15, 1988; Havasteen et al., Biochemical Pharmacology, 32:1141-1148, 1983)、酸化防止作用、ビタミンP作用、紫外線吸収作用、高血圧抑制、抗不整脈作用 (antiarrhythmic activity)、抗炎症、抗アレルギー性、血中コレステロール低下、肝毒性抑制、不妊の治療作用などを有しているため、食べ物、医薬品、化粧品などにその応用が期待されているが、今まで骨粗鬆症予防または治療と関連してクエルセチンを使用した例は報告されたことがなかった。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明のクエルセチン誘導体を有効成分として含有する骨粗鬆症治療剤を詳述する。

本発明者らはクエルセチン誘導体が骨芽細胞 (osteoblast) 及び破骨細胞 (osteoclast) の細胞増殖に与える効果を検索するため、骨粗鬆症治療効果があると知られている植物エストロゲン (phytoestrogen) であるゲニステイン (genistein) とクエルセチンの骨粗鬆症治療効果を比較した結果、クエルセチンはゲニステインより骨芽細胞の細胞増殖促進効果及びアルカリホスファターゼ (ALP) 活性増加効果に優れ、破骨細胞は細胞増殖抑制効果が優秀であることを確認した。かつ、卵巣摘出白鼠に対する動物実験結果、クエルセチン誘導体の投与が体内ホルモンの変化を大きく引き起こさなかったところ、現在骨粗鬆症の治療剤として使用されているエストラジオールの副作用である子宮肥厚などを誘発しない安全な薬物であることが確認できた。また、クエルセチン誘導体は海綿骨の面積変化の多い脛骨でエストラジオールより海綿骨の面積増加効果が高く現れ、造血機能や免疫系にいずれの影響を与えないことと確認された。

従って、前記結果により、本発明のクエルセチン誘導体は、従来の骨粗鬆症治療剤として主に使用されていた植物エストロゲンであるゲニステインに比べ、骨芽細胞の細胞増殖促

10

20

30

40

50

進効果及び破骨細胞の細胞増殖抑制効果が優秀でのみならず副作用が少なく、体内ホルモンの変化を大きく誘発せず造血機能や免疫系に影響を与えない安全な薬物であって、骨粗鬆症治療剤または予防剤として有用に使用されることが分かった。

【製剤化】

前記骨粗鬆症治療効果に優れたクエルセチン誘導体は薬学的に許容可能な結合剤（例えば、ポリビニールピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース）、崩解剤（例えば、カルボキシメチルセルロースカルシウム、澱粉グリコール酸ナトリウム）、稀釈剤（例えば、トウモロコシ澱粉、乳糖、大豆油、結晶セルロース、マンニトール）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク）、甘味剤（例えば、白糖、果糖、ソルビトール、アスパルタム）、安定剤（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、 α または β シクロデキストリン、ビタミンC、クエン酸、白濁）、保存料（例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸プロピル、安息香酸ナトリウム）及び香料（例えば、エチルバニリン、マスキングフラボール、メントルフラボノ、ハーブ香）と混合して錠剤、カプセル剤、軟質カプセル剤、液剤、軟膏剤、丸剤、散剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、坐剤または注射剤などの経口投与製剤または非経口投与製剤などの薬学的製剤に製造される。かつ、骨粗鬆症予防及び治療剤としての効能増進のためにカルシウムやビタミンD₃を製剤化時に添加できる。特に、本発明の薬学的組成物を非経口に投与する場合、非経口投与は皮下注射、静脈注射、筋肉内注射または胸部内注射注入方式による。非経口投与用剤型に製造化するためクエルセチン誘導体を安定剤または緩衝剤と共に水で混合して溶液または懸濁液で製造し、これをアンプルまたはバイアルの単位投与型に製剤化できる。

【投与量】

本発明の骨粗鬆症治療剤の薬学的組成物において、クエルセチン誘導体の有効量は2ないし20mg/kg、望ましくは8ないし12mg/kgであり、前記有効容量は患者の年齢、性別、症状、投与法、予防目的により1日1回以上を患者に投与できる。

【クエルセチンの安全性】

本発明のクエルセチン誘導体はマウスに経口投与時及び腹腔内投与時の毒性を試験した結果、経口毒性試験による50%致死量(LD₅₀)は少なくとも160mg/kg以上なので、既に安全性が報告されており（参照：M. Sullivan et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 77:269, 1951）、本発明では肝、腎臓、脳、子宮、皮膚、脛骨を対象に副作用を調べて見たところ、肝、腎臓、脳、脛骨及び皮膚の重さに影響を与えず、特に現在骨粗鬆症治療剤が有している副作用である子宮肥厚を表さなかったところ、本発明のクエルセチン誘導体がホルモン製剤として骨粗鬆症治療に安全に使用されうることが再確認することができた。

以下、実施例を通して本発明をさらに詳述する。これら実施例はただ本発明をさらに具体的に説明するためのもので、本発明の要旨により本発明の範囲がこれら実施例により限られないことは当業界において通常の知識を持つ者にとって自明であろう。

【実施例1】：骨芽細胞の細胞増殖効果

クエルセチンが骨芽細胞(osteoblast)の細胞増殖に及ぼす効果を検索するため、人の類似骨芽細胞株(human osteoblast-like cell line)であるSaos-2細胞を使用して、植物エストロゲン(phytoestrogen)の一種であって現在骨粗鬆症治療剤として多くの研究がなされているゲニステイン(genistein)を比較物質にして骨芽細胞の細胞増殖に及ぼす効果を次のように検索した。

【実施例1-1】：骨芽細胞の選別及び細胞培養

骨の構成成分である骨芽細胞に似ている性質を示すSaos-2細胞株をソウル大学医学部癌研究所(Cancer Research Institute)の韓国細胞株バンク(Korean Cell Line Bank)から分譲され実験に使用した。

Saos-2細胞は10%(v/v)FBS、ペニシリン100unit/ml、ストレプトマイシン100μg/mlを含むRPMI 1640培地(Gibco BRL, U.S.A.)を使用して湿式条件、37℃で5%(v/v)CO₂培養器で培養し、培地

10

20

30

40

50

は1週間に2～3回交換し、1週間に1回継代培養した。前記細胞株は培養プラスコに単一層 (monolayer) を形成し成長する特性があるため、継代培養時は0.25% (w/v) トリップシン (trypsin) 溶液を使用して単一層を剥離させた。

【実施例1-2】：薬物の濃度による細胞増殖実験

Saos-2細胞株を96-ウェルプレートに20,000細胞/ウェルに分配しクエルセチン (1% in DMSO (dimethylsulfoxide)) を 10^{-2} ～ 10^{-9} mg/mlの濃度になるよう各濃度別に6つのウェルに添加した。一方、対照群としてはクエルセチンを添加しないものを使用し、比較群としては現在骨粗鬆症治療剤として主に研究されているゲニステインを濃度別にウェルに添加した。次いで、37℃培養器で3日間培養し、これにMTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Triazolyl Blue) を0.05 mg/ml濃度に加えて同一な条件下で4時間さらに培養した後、生きている細胞数に比例して生成された濃い紫色のフォルマザン (formazan) 結晶をDMSOで溶解させエリサリーダー (ELISA reader) で550 nmにおける吸光度を測定した。この際、細胞増殖率 (%) は下記の式のように、クエルセチンを添加しない対照群ウェルの吸光度に対するクエルセチン添加ウェルの吸光度の比として計算し、クエルセチンを同様な濃度で処理した6個ウェルの値の平均を計算してクエルセチンによる骨芽細胞増殖率 (%) を比較した (参照：表1)。

$$\text{細胞増殖率 (\%)} = \frac{\text{クエルセチン添加ウェルのOD550nm平均} - \text{空ウェルのOD550nm平均}}{\text{対照群ウェルのOD550nm平均値}} \times 100$$

【実施例1-3】：アルカリホスファターゼ (ALP) 活性検索

骨芽細胞は細胞特異的にアルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase, ALP) 活性を示すので、本発明に係るクエルセチンが骨芽細胞でALP活性に与える影響を下記のような方法により調べて見た：前記実施例1-2のMTT実験で同一な細胞数のSaos-2細胞株に試験物質を同一な濃度に処理し同一な条件下で3日間培養後収穫した。この際、比較群としてはゲニステインを使用した。一方、ALPがp-ニトロフェニルフォスフェート (p-nitrophenyl phosphate) をp-ニトロフェノール (p-nitrophenol) とフォスフェート (phosphate) に分解させることを用いて405 nmにおける吸光度の変化を分析してALP活性を測定した (参照：表1)。

【表1】

クエルセチンによる骨芽細胞の細胞増殖効果

濃度 (mg/ml)	クエルセチン (対照群の%)		ゲニステイン (対照群の%)	
	MTT検索法	ALP活性	MTT検索法	ALP活性
対照群	100.0 ±2.5	100.0 ±1.6	100.0 ±0.6	100.0 ±7.3
1×10^{-9}	93.1 ±0.8*	98.1 ±0.0	91.3 ±0.6*	106.1 ±6.4
1×10^{-8}	93.9 ±0.8	104.4 ±3.9	96.9 ±2.7	101.5 ±8.8
1×10^{-7}	98.6 ±1.0	101.2 ±3.1	95.9 ±1.6	109.3 ±9.6
1×10^{-6}	96.0 ±1.0	127.2 ±3.5**	90.5 ±0.9**	103.8 ±8.7
1×10^{-5}	95.8 ±1.1	116.5 ±3.7	97.3 ±1.6	113.5 ±7.3
1×10^{-4}	96.5 ±0.8	113.5 ±2.3	95.7 ±0.7	121.1 ±6.2
1×10^{-3}	98.3 ±0.8	107.3 ±1.5	85.5 ±1.1**	98.8 ±6.9
1×10^{-2}	108.6 ±2.2**	106.1 ±4.3	66.2 ±2.8**	62.3 ±3.4

*: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

前記表1に示した通り、MTT検索法を通した細胞増殖実験においてクエルセチンは $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$ 濃度では薬物を処理しない対照群と細胞増殖効果にさほど違いがないと現れたが、 $1 \times 10^{-2} \text{ mg/ml}$ の濃度では対照群の約109%に当る最大細胞増殖効果を示すことが分かった ($p < 0.01$)。一方、比較物質として使用したゲニステインをMTT検索において $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-2} \text{ mg/ml}$ の濃度で処理した場合、 $1 \times 10^{-9} \text{ mg/ml}$ 濃度で対照群の91% ($p < 0.05$)、 $1 \times 10^{-6} \text{ mg/ml}$ 濃度で90.5% ($p < 0.01$)、 $1 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$ 濃度で86% ($p < 0.01$)、それから $1 \times 10^{-2} \text{ mg/ml}$ 濃度で66% ($p < 0.01$)に現れたところ、ゲニステインは骨芽細胞の細胞増殖を促進する効果を示すことよりもかえって骨芽細胞の細胞増殖を抑える効果を示すことが確認できた。

かつ、ALP活性においてクエルセチンは $1 \times 10^{-6} \text{ mg/ml}$ 濃度で対照群の127%で最大ALP活性を示した ($p < 0.01$)。一方、ゲニステインは $1 \times 10^{-4} \text{ mg/ml}$ 濃度で対照群の121%でALP活性効果を示したため、ALP活性面において本発明のクエルセチンはゲニステインより約100倍以上の活性を示したことが分かる。ところ、現在骨粗鬆症治療剤として研究されているゲニステインより本発明のクエルセチンが骨芽細胞の細胞増殖促進効果及びALP活性増加効果に優れることを確認することができた。

【実施例2】：破骨細胞の細胞増殖効果

クエルセチンが破骨細胞 (osteoclast) の増殖を抑えられるかを調べるため、下記のような実験を施した。

【実施例2-1】：破骨細胞の選別及び細胞培養

ICRマウス (韓国化学研究所、大田、韓国) に4週間カルシウム欠乏食餌 (ICN Biomedicals, Inc., Ohio, U.S.A.) を提供しつつ破骨細胞の活性を増加させた。このようなマウスの左右脛骨と大腿骨を周りの筋肉組織なしで綺麗に切り取った後、クリーンベンチで大腿骨と左右脛骨を細分して予め氷に入れておいたペニシリン100 unit/mlとストレプトマイシン100 $\mu\text{g/ml}$ を含有する $\alpha\text{-ME}$

10

20

30

40

50

Mに入れて1分間強く振盪して破骨細胞を培地で抽出した。これを氷に5分間放置した後、細胞浮遊液を $800 \times g$ で3分間遠心分離し、沈澱された細胞をペニシリン 100 unit/ml とストレプトマイシン $100 \mu\text{g/ml}$ 及び0% (v/v) FBSを含有する α -MEMの培養培地に浮遊させた。培養培地に浮遊させた細胞を24-ウェルプレートにウェル当たり 3.5×10^6 細胞数を分配した。

【実施例2-2】：薬物の濃度による細胞増殖実験

前記実施例2-1の破骨細胞にクエルセチンを 1×10^{-8} ないし $1 \times 10^{-2} \text{ mg/ml}$ 濃度で添加し、二日目に市販されるキット(kit) (Sigma Chemical Co., U. S. A.) を使用してTRAP染色 (Tartrate-resistant acid phosphatase staining) を施した。次いで、TRAP染色により赤色を帯びる三つ以上の核を有するTRAP-陽性細胞 (TRAP-positive MNC) を破骨細胞と判定して、その数を算定することにより破骨細胞の数を測定した (参照：表2)。

【表2】

クエルセチンによる破骨細胞の細胞増殖効果

濃度 (mg/ml)	破骨細胞の (対照群の%)
対照群	100.0 ± 8.1
1×10^{-8}	100.9 ± 1.8
1×10^{-6}	96.8 ± 2.7
1×10^{-4}	89.6 ± 3.2
1×10^{-3}	$61.1 \pm 4.1^*$
1×10^{-2}	$24.7 \pm 5.7^{**}$

*: $p < 0.05$,

** : $p < 0.01$

前記表2に示した通り、クエルセチンの濃度が 1×10^{-8} ないし $1 \times 10^{-4} \text{ mg/ml}$ の場合、破骨細胞の細胞増殖抑制効果がさほど高くなかったが、 $1 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$ 濃度では対照群の61% ($p < 0.05$)、 $1 \times 10^{-2} \text{ mg/ml}$ 濃度では対照群の25% ($p < 0.01$) に細胞増殖が抑えられるところ、クエルセチンが破骨細胞の細胞増殖を著しく抑えることを確認することができた。

前記実施例1及び2の結果から、本発明のクエルセチンは $1 \times 10^{-2} \text{ mg/ml}$ 濃度で骨芽細胞の細胞増殖促進効果及び破骨細胞の細胞増殖抑制効果を全て示す骨粗鬆症治療剤の理想的な薬物であることを確認することができた。

【実施例3】：卵巣摘出白鼠に対するクエルセチンの効果

閉経期以後第I型 (type I) 骨粗鬆症が発病するSD (Sprague-Dawley) 系の雌白鼠を対象にしてクエルセチンの効果を実験した。実験材料としては韓国化学研究所で分譲された生後10週になった体重 $200 \sim 300 \text{ g}$ ほどの雌白鼠を使用し、実験過程は白鼠の卵巣摘出術の施行、各群による薬物投与、摘出術後一定期間毎にネズミを犠牲して体重変化、体内臓器組織観察、海綿骨面積の変化、全血球数及び血漿の生化学的検査に分けて次のように実験を行った。

【実施例3-1】：卵巣摘出術及び薬物投与

卵巣摘出術はSham群 (正常群) を除き対照群と試験群の全ての雌白鼠で両側卵巣摘出術を次のように試行した：ケタミン (Ketamine、柳韓洋行、韓国) 5 mg/100 g とキシラジン (Xylazine、韓国ヴァイエール、韓国) 1 mg/100 g を白鼠の左側及び右側後肢大腿根に筋肉注射して雌白鼠を全身麻酔させた後、下腹部の毛を除去し動物の体位を横にならせた状態でボタジン液 (ヨード、三一製薬、韓国) で手術部位を

10

20

30

40

50

消毒した後、無菌操作下で正中線を中心に下腹部で2cmほどに皮膚・腹筋及び腹膜を開き、消毒されたピンセットで卵巣を露出させ卵管を絹糸で結紮した後左右卵巣を摘出した。次いで、抗生剤（スルファボルター4、ユニ化学株式会社、韓国）0.3mlを腹腔内に注入して感染を防止し、絹糸及びナイロン糸で腹膜、腹筋及び皮膚を縫合した。また、Sham群は卵巣摘出を除いた全ての手術を行った動物で卵巣を摘出し薬物投与を行わない対照群の卵巣摘出による変化を比較するために使用され、対照群は卵巣摘出術を行い薬物投与を施した投与群の動物と比較して薬物投与による変化を比較するために使用された。

薬物投与時、薬物投与前後一定期間中（卵巣摘出前、摘出後、投与1～9週）血液を尾静脈内でカテタ（B.D社：24G）を用いて1.5ml採取（heparin：75IU）し全血球数測定（Coulter社：JT）及び血漿の生化学的検査（Crony社：エアロン200）を施し、剖検時後大静脈で採血して前述したような分析を施した後、大腿骨内の海綿骨面積の変化及び体内臓器組織の観察のために各試料を冷凍保管した。

卵巣摘出後、1週後からSham群と対照群は10% Tween 80溶液を、E2群は17β-エストラジオールを1μg/kg/dayに、試験薬物投与群は試験薬物でクエルセチンまたはゲニステインをそれぞれ10mg/kg/day濃度で9週間腹腔注射して、毎週各群の体重変化を測定した。投与後、1週間に1回ずつ採血し、9週間投与した後はできるだけ血液全量をヘパリンで処理して取った後、CBC（Complete Blood Count）検査を行い3,000rpmで20分間遠心分離して血漿を取った後次の実験まで-70℃で冷凍保管した。かつ骨密度検査のため、5、6番腰椎骨（lumbar）、右側の脛骨（tibia）を分離し、4%（v/v）ホルマリン（formalin）溶液に保管した。

【実施例3-2】：クエルセチンの投与による体重変化

前記実施例3-1のSham群、17β-エストラジオールが処理されたE2群、クエルセチンまたはゲニステインがそれぞれ処理された試験薬物群の体重を手術後10週間毎週測定した（参照：表3）。

【表3】

薬物投与による体重変化測定

週	体重 (g)				
	対照群	Sham群	E 2 群	クエルセチ ン 処理群	ゲニステ イン処理 群
手術前	219.39± 4.05	220.70±4.6 3	228.51±8.1 1	221.87± 7.57	217.55± 7.24
手術後1	244.98± 3.00	231.51±4.6 8	249.50±8.1 6	241.73± 4.83	242.12± 5.96
手術後2	274.29± 3.68**	236.40±5.0 6##	264.97±8.3 5	271.70± 5.79**	270.00± 8.05**
手術後3	299.37± 3.74**	245.56±4.7 9***	279.87±8.1 5**	295.00± 3.89**	296.20± 7.68**
手術後4	315.20± 3.84**	248.96±5.0 2***	292.83±9.2 5**	312.07± 5.95**	310.80± 7.80**
手術後5	320.30± 4.83**	255.43±5.1 4***	296.96±9.4 4**	320.25±6.7 6**	317.29±7. 93**
手術後6	329.03± 5.05**	261.49± 6.46***	304.49±8.4 0**	326.68±6.7 3**	327.19±8. 31**
手術後7	337.39± 5.93**	264.78± 5.53***	313.04±8.7 3**	333.25±7.6 1**	332.80±9. 23**
手術後8	340.01± 6.60**	268.16± 5.40***	315.87±8.3 2**	335.09±6.6 5**	336.38±9. 01**
手術後9	347.96± 7.58**	273.81± 4.54***	319.95±9.4 7**	343.02±6.9 6**	342.71±8. 26**
手術後 10	356.73± 7.13**	275.22± 4.30***	320.00±5.9 0**	346.27±6.3 9**	347.23±7. 57**

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, 手術前と比較,#*: $p < 0.05$, ##*: $p < 0.01$, 対照群と比較,

前記表 3 に示した通り、Sham 群は手術後 3 週 ($p < 0.05$) から手術前と比較して体重が増加し、対照群は手術後 2 週 ($p < 0.01$) から体重が増加された。すなわち、対照群は Sham 群に比べて急激な体重の増加を示したが、このような体重の増加はエストラジオールの投与により鈍化され、E 2 群の手術後 20 週では対照群と比較して低い体重増加を示した ($p < 0.05$)。一方、植物エストロゼンの一種であるクエルセチンとゲニステインが 10 mg/kg/day 濃度で投与された試験薬物群では卵巣摘出後も対照群と類似に急激な体重増加を示すことを確認することができた。従って、クエルセチンの投与が体内ホルモンの変化を大幅に誘発させないことを確認できた。

【実施例 3-3】：クエルセチンによる体内臓器組織の重さ変化

実験動物に投与されたクエルセチンが体内臓器組織に与える影響を調べるため、手術後 9 週間薬物を投与した実験動物から肝 (liver)、腎臓 (kidney)、脳 (bra

10

20

30

40

50

in)、子宮(uterus)、皮膚(skin)、脛骨(tibia)を摘出してそれぞれの重さ(wet weight)を測定した(参照:表4)

【表4】

薬物投与後体内長期組織の重さ変化

	対照群	Sham群	E2群	クエルセチン 処理群	ゲニステイン 処理群
肝(g)	9.84±0.33	9.52±0.48	9.22±0.43	9.07±0.30	10.03±0.36
腎臓(g)	1.95±0.09	1.91±0.05	1.85±0.09	1.84±0.05	1.83±0.03
脳(g)	2.03±0.04	1.93±0.02	1.98±0.05	1.98±0.04	1.98±0.03
脛骨(g)	0.559±0.025	0.514±0.013	0.504±0.019	0.554±0.019	0.537±0.008
皮膚(mg)	193±7	169±8	193±6	197±11	188±9
子宮(mg)	79±4	450±29*	279±10**	85±6	106±3

** : $p < 0.01$

前記表4に示した通り、肝、腎臓、脳、脛骨及び皮膚の重さは正常対照群であるSham群と卵巣摘出対照群及び薬物投与群の全てで差を示さなかったが、卵巣から分泌されるエストロゼンにより影響される子宮の重さはSham群に比べて卵巣摘出対照群で大幅に減少され($p < 0.01$)、卵巣摘出後E2の投与はこのような子宮の退化を抑えた(対照群と比較して $p < 0.01$)。一方、植物エストロゼンであるクエルセチンとゲニステインの投与は子宮の重さを変らせないところ、現在骨粗鬆症の治療剤として使用されているE2は子宮肥厚などの副作用がある一方、クエルセチンはE2のような副作用が現れなくてクエルセチンを安全に薬物として使用可能なことを確認することができた。

【実施例3-4】：クエルセチンの投与による海綿骨面積の変化

9週間薬物を投与した各群から摘出された腰椎骨(lumbar)及び脛骨(tibia)における海綿骨の面積(trabecular bone area, TBA)は次のような方法により測定した：すなわち、定量的映像分析器(Quantitative image analysis system, Wild Leitz Co.)のデジタル化装置(digitizer)で各海綿の輪郭線に沿って描いてコンピュータ画面に映像を得、各脛骨の近位部で成長板の直下部のうち横辺の長さが成長板の長さの約2/3ほどになる長さに基準面積 $2 \times 10^6 \mu m^2$ である長方形の内部に存する海綿骨の平均面積をコンピュータを用いて求めた。かつ、その長方形の内部の海綿骨の個数を求めた後、平均面積に個数をかけてそれぞれの骨標本の海綿骨の面積を求めた後統計処理した(参照：表5)。

【表5】

薬物投与による脛骨の海綿骨面積(TBA)の変化

	TBA ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)	増減率 (%)
対照群	34.62 \pm 2.62	100.00 \pm 7.55
Sham群	85.55 \pm 5.31**	247.07 \pm 15.33**
E 2 処理群	51.40 \pm 2.28	148.46 \pm 6.59
クエルセチン処理群	55.52 \pm 7.68*	160.34 \pm 22.17*
ゲニステイン処理群	47.65 \pm 2.07	137.62 \pm 5.98

*: $p < 0.05$,**: $p < 0.01$

前記表 5 に示した通り、脛骨の場合対照群は $34.62 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ で正常群である Sham 群の $85.55 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ に比べて大幅に減少され ($p < 0.01$) 骨粗鬆症が誘発されていることが分かり、このような海綿骨の減少は E 2、クエルセチン及びゲニステインの処理によりそれぞれ対照群の 148%、160% 及び 138% に海綿骨の面積が増加する傾向があり、特にクエルセチンを処理する場合、海綿骨面積の増加が著しい ($p < 0.05$) ことが分かった。

前記と同様な測定方法を用いて実験動物に 9 週間の薬物投与後摘出した腰椎骨 (lumbar) における海綿骨の面積を測定した (参照: 表 6)。

【表 6】

薬物投与による腰椎骨の海綿骨面積(TBA)の変化

	TBA ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)	増減率 (%)
対照群	67.53 \pm 2.31	100.00 \pm 3.42
Sham群	93.70 \pm 5.29**	138.76 \pm 7.84**
E 2 処理群	89.16 \pm 2.83**	132.04 \pm 4.19**
クエルセチン処理群	87.38 \pm 4.53*	129.40 \pm 6.71*
ジェニステイン処理群	86.58 \pm 3.00*	128.23 \pm 4.45*

*: $p < 0.05$,**: $p < 0.01$

前記表 6 に示した通り、腰椎骨の場合対照群は $67.53 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ であって Sham 群の $93.70 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ に比べて減少されるが ($p < 0.01$) E 2、クエルセチン及びゲニステインの投与でそれぞれ対照群の 132% ($p < 0.01$)、129% ($p < 0.05$) 及び 128% ($p < 0.05$) に増加され卵巣摘出により誘発された海綿骨面積の減少を抑える効果があることと現れた。特に、クエルセチンは海綿骨の面積変化

10

20

30

40

50

が多い脛骨で現在治療剤として使用されるE2より海綿骨の面積増加効果が高く現れたし、E2の副作用である子宮の肥厚現象も現れなかったため、骨粗鬆症治療剤としてクエルセチンがE2よりさらに効果的であることが分かった。

【実施例3-5】：全血球数の測定

体内の状態及び異常現象をそのまま反映する血液の全血球数 (complement blood cell、CBC) を測定して薬物投与による実験動物の異常有無を判明した。すなわち、手術前のネズミから得られた血液と手術後薬物を投与し、10週が経過されたネズミから得られた血液の赤血球 (red blood cell、RBC) の数、血色素 (hemoglobin、Hb) の濃度及び赤血球容積比 (hematocrit、Ht) を測定して造血機能の異常有無を調べ、白血球の数、リンパ球の数、単核球の数及び顆粒球の数を測定して比較することにより、炎症反応や組織の壊死など免疫系の異常有無を判断した (参照：表7)。

【表7】

薬物投与による全血球数の変化

	手術	対照群	Sham群	E2群	クエルセチン 処理群	ゲニステイン 処理群
赤血球の数 ($\times 10^6$ cells/ μ l)	前	7.36 \pm 0.11	7.19 \pm 0.11	7.33 \pm 0.13	7.29 \pm 0.15	7.32 \pm 0.13
	後	7.08 \pm 0.09	6.75 \pm 0.24	6.97 \pm 0.14	7.13 \pm 0.15	7.17 \pm 0.13
血色素の濃度 (g/dl)	前	16.09 \pm 0.21	15.75 \pm 0.20	15.86 \pm 0.24	16.00 \pm 0.3 0	15.82 \pm 0.27
	後	14.58 \pm 0.20**	14.09 \pm 0.48**	14.34 \pm 0.29**	14.84 \pm 0.22*	14.70 \pm 0.22**
赤血球容積比 (%)	前	43.34 \pm 0.48	43.09 \pm 0.61	43.11 \pm 0.55	43.62 \pm 0.83	42.76 \pm 0.65
	後	39.48 \pm 0.60**	38.39 \pm 1.24**	38.86 \pm 0.72**	41.10 \pm 0.68*	40.66 \pm 0.56*

10

20

30

白血球の数 ($\times 10^3$ cells/ μ l)	前	26.13 \pm 4.63	25.61 \pm 3.64	23.14 \pm 1.50	20.28 \pm 3.77	27.30 \pm 4.85
	後	21.66 \pm 2.89	12.74 \pm 2.88*	13.26 \pm 0.97**	18.50 \pm 7.60	21.50 \pm 2.53
リンパ球の数 ($\times 10^3$ cells/ μ l)	前	22.14 \pm 4.49	18.04 \pm 2.38	17.80 \pm 1.72	16.78 \pm 3.52	19.68 \pm 4.52
	後	21.20 \pm 9.00	10.20 \pm 2.88	10.23 \pm 0.96**	15.00 \pm 7.71	15.25 \pm 3.21
単核球の数 ($\times 10^3$ cells/ μ l)	前	1.02 \pm 0.18	0.73 \pm 0.17	1.44 \pm 0.29	0.65 \pm 0.07	0.77 \pm 0.09
	後	1.10 \pm 0.21	0.95 \pm 0.14	1.02 \pm 0.24	1.00 \pm 0.20	0.80 \pm 0.19
顆粒球の数 ($\times 10^3$ cells/ μ l)	前	2.99 \pm 0.44	2.83 \pm 0.39	3.67 \pm 0.40	2.80 \pm 0.30	2.23 \pm 0.10
	後	2.52 \pm 0.21	1.93 \pm 0.26	1.99 \pm 0.25**	2.43 \pm 0.12	2.38 \pm 0.37

*: $p < 0.05$,**: $p < 0.01$

前記表 7 に示した通り、赤血球の数は全ての群で手術前と手術後に全く変化がなく、血色素の濃度及び赤血球容積比は全ての群で手術後に減少された。一方、白血球の数は対照群とクエルセチン及びゲニステインの投与群で手術前と手術後に変化がなかったが、Sham 群及び E 2 群では手術後に減少することが分かった。かつ、リンパ球と顆粒球は E 2 群でのみ急激に減り、単核球は全ての群で変化がなかった。従って、クエルセチンの投与は造血機能や免疫系に影響を与えない安全な薬物であることが確認できた。

【実施例 3-6】：クエルセチンによる血漿の生化学的変化

血液は身体の状態をそのまま反映するので、血漿内の色々の生化学的指標を検査してクエルセチンの体内安定性を確認した：すなわち、手術前ネズミの血液、手術後 1 週が経過されたネズミの血液及び手術後 10 週経過したネズミの血液を修得し、アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase、ALP)、カルシウム、無機磷酸 (inorganic phosphate)、血中尿素窒素 (blood urea nitrogen、BUN)、クレアチニン、総コレステロール、HDL-コレステロール及び LDL-コレステロールの血中数値を測定した (参照：表 8)。

【表 8】

10

20

30

薬物投与による血漿内生化学的指標の変化

項目	手術	対照群	Sham群	E 2 群	クエルセチ ン 処理群	ゲニステ イン 処理群
ALPの濃 度 (U/Dl)	前	262.75± 23.31	245.59±2 2.05	196.01± 28.34	232.83±2 0.27	208.86± 19.72
	1週	265.75± 22.78	215.18± 20.22	195.24± 27.87	226.67± 23.20	212.10± 17.92
	10週	198.31± 14.64	135.09± 18.64***	123.99± 22.18	156.42±1 3.08	127.14±9. 95****
カルシウ ムの濃度 (mg/dL)	前	10.48± 0.43	10.57± 0.55	10.86± 0.40	10.73± 0.48	10.61± 0.49
	1週	9.98± 0.34	10.35± 0.17	10.03± 0.18	8.37± 0.24***	8.97± 0.29 [#]
	10週	10.83± 0.16	11.79± 0.23**	11.20± 0.16 ^s	10.26±0. 19 [†]	10.44±0.2 2 ^s
無機磷酸 の濃度 (mg/dL)	前	6.52±0.3 9	6.87±0.6 2	6.90±0. 52	6.79± 0.66	7.18±0.48
	1週	6.27± 0.31	6.59± 0.20	6.13±0. 12	6.21±0.1 8	6.47±0.16
	10週	4.95± 0.41**	6.09± 0.47	5.51± 0.45	5.73± 0.58	5.62± 0.25 [†]
血中尿素 窒素の濃 度 (mg/dL)	前	18.56±0. 92	17.13±1. 11	18.36± 1.01	17.05± 0.60	16.82± 0.60
	1週	18.31± 0.70	16.75± 0.58	17.79± 0.76	18.06±0. 88	18.26±0.9 4
	10週	21.20± 1.06	19.23± 0.84	19.99± 0.86	18.19± 0.41	18.31± 0.86
クレアチ ニンの濃	前	0.54±0.0 5	0.56±0.0 6	0.55±0. 05	0.57±0.0 5	0.51±0.04

10

20

30

40

度 (mg/dL)	1週	0.54± 0.05	0.62± 0.04	0.57± 0.03	0.59± 0.01	0.64± 0.02*
	10週	0.78± 0.03 ^{###}	0.80± 0.03 ^{**}	0.81± 0.03 ^{###}	0.82±0.0 4 ^{###}	0.82±0.04 ^{###}
	前	72.66± 5.00	79.67± 1.73	76.79± 2.80	77.55± 5.13	85.51± 5.45
総コレステロールの濃度 (mg/dL)	1週	93.32± 4.75 [†]	79.75± 2.46	95.53± 4.17	85.84±3. 82	91.56±3.6 5
	10週	120.44± 5.21 ^{###}	88.60± 4.87 ^{**}	115.05± 5.75 ^{###}	107.73± 2.24 ^{**}	121.07±6. 53 ^{**}
	前	53.78±2. 77	52.33±2. 61	52.30± 2.01	53.38± 3.14	61.12± 3.57
HDL-コレステロールの濃度 (mg/dL)	1週	46.20± 0.62	41.69± 1.47	49.03± 3.37	42.49±4. 85	35.26±1.9 2 ^{**}
	10週	29.60± 2.63 ^{###}	22.32± 2.49 ^{###}	24.94± 2.72 ^{###}	25.13± 2.78 ^{**}	29.27± 1.98 ^{**}
	前	18.88±3. 15	26.63±3. 04	24.49± 1.63	24.17± 3.13	24.39± 3.63
LDL-コレステロールの濃度 (mg/dL)	1週	42.80± 6.41 ^{**}	36.30± 0.63	40.50± 6.17	40.85±4. 88	60.47±7.0 4 ^{**}
	10週	90.84± 4.27 ^{###}	69.29± 3.05 ^{###}	88.33± 4.74 ^{###}	82.60± 4.85 ^{###}	91.80± 6.57 ^{###}
	前	18.88±3. 15	26.63±3. 04	24.49± 1.63	24.17± 3.13	24.39± 3.63

*: p<0.05, **: p<0.01, 対照群と比較

#: p<0.05, ##: p<0.01, 手術前と比較

‡: p<0.05, ‡‡: p<0.01, 手術後1週と比較

前記表 8 に示した通り、骨代謝に直接に関わりのある ALP は全ての群で週令の増加により活性度が減少する傾向を示したが、特に Sham 群とゲニステイン投与群では手術前及び手術後 1 週経過したネズミに比べ、手術後 10 週経過したネズミにおいて大幅に減り、カルシウムの濃度はさほど変わらず、無機磷酸は対照群及びゲニステイン投与群で手術前に比べて手術後 10 週経過されたネズミで大きく減少された。

一方、タンパク質代謝及び筋肉量と関わりある血中尿素窒素は全ての群において適正レベルを維持したが、クレアチニンは全ての群で増加された。

かつ、閉経期以降の女性にとって増加すると報告された総コレステロールの量も全ての群で増加する様相を示したが、Sham 群は比較的低い増加率を示した。また、HDL-コレステロールは全ての群において経時的に減少することに比べ、LDL-コレステロールは経時的に増加する傾向を示した。このような現象は正常群である Sham 群や卵巣摘出実験群において全て同じく現れた。

従って、本発明に係るクエルセチンは骨粗鬆症の予防及び治療に効果的に使用されることが分かった。

【実施例 4】：クエルセチンの製剤化

【実施例 4-1】：シロップ剤の製造

本発明のクエルセチン、その誘導体及び薬学的に許容されるその塩を有効成分 2% (w/

10

20

30

40

50

v) で含有するシロップを次のような方法で製造した：クエルセチンの塩酸塩、サッカリン、糖を温水 80 g に溶解させ冷却させた後、グリセリン、サッカリン、香料、エタノール、ソルビン酸及び蒸留水を含有する溶液を製造して混合した後、この混合物に水を添加して 100 ml のクエルセチンシロップ剤を製造した。前記シロップ剤の成分は次の通りである：

クエルセチンの塩酸塩	2 g
サッカリン	0.8 g
糖	25.4 g
グリセリン	8.0 g
香料	0.04 g
エタノール	4.0 g
ソルビン酸	0.4 g
蒸留水	適量

10

【実施例 4-2】：錠剤の製造

本発明のクエルセチン、その誘導体及び薬学的に許容されるその塩を有効成分として含有する錠剤を次のような方法で製造した：クエルセチンのフラボノイド誘導体・塩酸塩 250 g をラクトース 175.9 g、芋澱粉 180 g 及びコロイド性珪酸 32 g と混合し、10% (w/v) ゼラチン溶液を添加させた後、粉碎して 14 メッシュ体を通させた後乾燥させ、芋澱粉 160 g、滑石 50 g 及びステアリン酸マグネシウム 5 g を添加して得た混合物を錠剤に製造した。前記錠剤の成分は次の通りである：

20

クエルセチンのフラボノイド誘導体・塩酸塩	250 g
ラクトース	175.9 g
芋澱粉	180 g
コロイド性珪酸	32 g
10% ゼラチン溶液	適量
芋澱粉	160 g
滑石	50 g
ステアリン酸マグネシウム	5 g

【実施例 4-3】：注射剤の製造

クエルセチンのフラボノイド誘導体・塩酸塩 1 g、塩化ナトリウム 0.6 g 及びアスコルビン酸 0.1 g を蒸留水に溶解させ 100 ml の溶液を製造し、これをビンにいった後、100℃で 30 分間加熱して滅菌させ、注射剤を製造した。前記注射剤の成分は次の通りである：

30

クエルセチンのフラボノイド誘導体・塩酸塩	1 g
塩化ナトリウム	0.6 g
アスコルビン酸	0.1 g
蒸留水	適量

産業上の利用可能性

以上述べた通り、本発明は骨芽細胞 (osteoblast) の細胞増殖促進効果及び破骨細胞 (osteoclast) の細胞増殖抑制効果に優れたクエルセチン誘導体を有効成分として含有する骨粗鬆症治療剤を提供する。本発明のクエルセチン誘導体は従来の骨粗鬆症治療剤に比べて骨芽細胞の細胞増殖促進効果及び破骨細胞の細胞増殖抑制効果に優れ、体内ホルモンの変化を誘発せず海綿骨の面積増加効果がさらに高く現れるのみならず、副作用がなく造血機能や免疫系に影響を与えない安全な薬物として確認され、骨粗鬆症治療剤に幅広く活用されうる。

40

以上本発明の特定部分を詳述したところ、当業界の通常の知識を持つ者にとって、このような具体的な記述はただ望ましい実施態様に過ぎず、これにより本発明の範囲が制限されることではない点は明らかである。従って、本発明の実質的な範囲は添付した請求項とそれらの等価物により定義される。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 March 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/17909 A1

- (51) International Patent Classification: A61K 31/353 (74) Agent: LEE, Han-Yeong, 8th Fl., Showun Bldg., 1675-1 Seocho-dong, Seocho-gu, Seoul 137 070 (KR).
- (31) International Application Number: PCT/KR01/00368
- (32) International Filing Date: 9 March 2001 (09.03.2001) (81) Designated States (national): AK, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Filing Language: Korean
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 200046916 14 August 2000 (14.08.2000) KR (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DG, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IL, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, NG, TD, TG).
- (71) Applicant for all designated States except US: KOREA INSTITUTE OF ORIENTAL MEDICINE (KR/KR); 4th Fl., Seohin Bldg., 129-11 Cheongdam-dong, Kangnam-gu, Seoul 135-765 (KR).
- (72) Inventors; and
(73) Inventors/Applicants (for US only): KIM, Chung-Sook (KR/KR); 4th Fl., Cheongdam Bldg., 129-11 Cheongdam-dong, Kangnam-gu, 135-100 Seoul (KR); HA, Hye-Kyung (KR/KR); 1-608 Sonal Garden Apartment, Dobong 1-dong, Dobong-gu, Seoul 132-017 (KR); SONG, Kye-Yong (KR/KR); 922-6 Banghoe-dong, Seocho-gu, Seoul 137-061 (KR).

Published:
with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/17909 A1

(50) Title: A THERAPEUTIC AGENT OF OSTEOPOROSIS COMPRISING AN ACTIVE INGREDIENT OF QUERCETIN DERIVATIVES

(57) Abstract: The present invention relates to a therapeutic agent of osteoporosis which comprises an active ingredient of quercetin derivatives. The quercetin derivatives of the invention can be practically applied for the treatment and prevention of osteoporosis, since they effectively inhibit osteoclast proliferation and stimulate osteoblast proliferation more than prior art therapeutic agents of osteoporosis, and increase trabecular bone area highly without changing hormone level in body and outward effects on hematopoietic function and immune system.

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

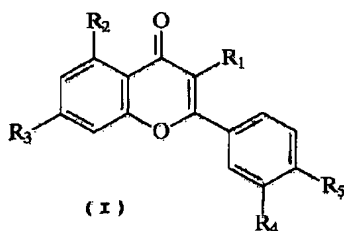
1

A THERAPEUTIC AGENT OF OSTEOPOROSIS COMPRISING AN ACTIVE
INGREDIENT OF QUERCETIN DERIVATIVES

5 BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

10 The present invention relates to a therapeutic agent
for osteoporosis which comprises an active ingredient of
quercetin derivatives, more specifically, to a therapeutic
agent for osteoporosis comprising an active ingredient of
quercetin derivatives represented by the following general
formula (I) which effectively stimulate osteoblast
15 proliferation and inhibit osteoclast proliferation.



20

Description of the Prior Art

Osteoporosis is a disease characterized by the
decrease of bone mass caused by mineral loss and the
25 subsequent expansion of marrow cavity. Bones become
brittle with the progress of the disease, and may be easily

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

2

fractured by a weak impact. Bone mass is affected by various factors such as genetic factors, nutritive condition, changes of hormone level, exercise and life style, and osteoporosis is known to be caused by aging, lack of exercise, low body weight, smoking, low calcium diet, menopause, and ovariectomy. In women, decrease of bone mass begins at the age of 30, and around menopause, concentration of estrogen rapidly decreases and vast amount of B-lymphocytes are accumulated by the similar mechanism to that of B-lymphocyte accumulation by IL-7(interleukin-7), and subsequent pre-B cell accumulation results in increased level of IL-6 which activates osteoclasts, thus, bone mass becomes decreased. In aged people, especially in women of postmenopause, osteoporosis is not the avoidable disease although the severity of the symptom may vary, therefore, many research groups and pharmaceutical companies have made a great deal of efforts for development of therapeutic agents for bone diseases to prevent and treat osteoporosis upon an increase of elderly population.

Therapeutic agents for osteoporosis now being used include estrogen preparations, androgenic anabolic steroid preparations, calcium supplements, phosphate preparations, fluoride preparations, ipriflavone, vitamin D3, etc. In recent years, novel drugs for osteoporosis have been developed, which include Arinobisphosphonate by Merck Co.(U.S.A.) in 1995 and Raloxifene which plays a role of selective estrogen receptor modulator(SERM) by Eli Lilly Co.(U.S.A.) in 1997.

Therapeutic agents for osteoporosis mentioned above are mostly estrogen substances which are known to cause adverse side effects such as cancer, cholelithiasis, and thrombosis. Since long term administration of drug is inevitable in the treatment of osteoporosis, there is a continuing need to develop novel effective agents which can replace estrogen with high safety even when administered for a prolonged period of time.

As estrogen substitutes, phytoestrogens such as soybean isoflavone have been reported. Phytoestrogen, first reported in 1946, was found interim of verifying the cause of clover disease which was named for the high increase(over 30%) of infertility of the sheep fed with red clover(*Trifolium subterraneum* var. *Dwalganup*). The cause of clover disease turned out to be an estrogen-like isoflavonoid contained in the plant, hence, the compound obtained from the plant has been named 'phytoestrogen'. After that, compounds reported as phytoestrogen includes isoflavone compounds such as daidzein, genistein, formononetin, and biochanin A, coumestan compounds such as coumestrol, lignan compounds such as enterolactone, and phenol compounds such as enterodiol. Such phytoestrogens exist mostly in the form of aglycone, 6'-O-acetylglucoside or 6'-O-malonylglucoside, and daidzein and genistein exist in the form of 7-O-glucoside. Among aforementioned compounds, glucosides are known to be hydrolysed with enterobacteria or gastric acid and absorbed in the form of aglycone which is a free isoflavone. The researches have revealed that the said phytoestrogens function similarly to the animal estrogens. That is, the phytoestrogen inhibit proliferation of breast cancer cells by binding to the estrogen receptor and have been reported to be used as the estrogen substitute for the treatment of cardiovascular diseases and other symptoms occurring in the postmenopause women. However, the said phytoestrogens are not widely used for the treatment and prevention of osteoporosis due to the insufficient pharmaceutical effectiveness and high cost required for the isolation and purification from natural products.

Under the circumstances, are strong reasons for developing and exploring alternative compounds with safety and effectiveness for the treatment and prevention of osteoporosis, which can be prepared in an economical manner.

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

4

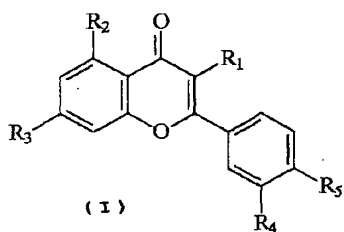
SUMMARY OF THE INVENTION

The present inventors have made an effort to develop an effective substitute agent for the treatment and prevention of osteoporosis, which is safe and economical, and have found that chemically synthesized quercetin derivatives have activities of stimulating osteoblast proliferation and inhibiting osteoclast proliferation, without any adverse side effects on internal organs, thus, quercetin derivative can be employed as an active ingredient of a therapeutic agent for osteoporosis.

A primary object of the present invention is, therefore, to provide a therapeutic agent for osteoporosis which comprises an active ingredient of quercetin derivatives.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides a therapeutic agent for osteoporosis which comprises an active ingredient of quercetin derivatives represented by the following general formula (I) and pharmaceutically acceptable carriers:



25

wherein,

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

5

R_1 is gentiotriose, glucopyranose, O-arabinofuranose, O-diglucofuranose, O-galactopyranose, O-galactoside-gallate, O-gentiobiose, O-glucopyranose, O-glucuronide, O-neohesperidose, O-rhamnopyranose, O-rutinose, 5 O-sophorose, O-xylopyranose, OCH_3 , OH, rhamnogenitobiose, rhamnoglucofuranose or sulfate;

R_2 is OH or O-glucopyranose;

R_3 is OCH_3 , OH, O-glucopyranose, O-glucuronopyranose or glucopyranose;

10 R_4 is OCH_3 or OH; and,

R_5 is OCH_3 , OH, O-glucopyranose or O-glucose.

Among the quercetin derivatives represented by general formula (I), well-known compounds are classified as follows: (1) a derivative group of the formula I wherein R_2 to R_5 are OH and R_1 varies, includes quercetin where R_1 is OH, avicularoside where R_1 is O- α -L-arabinofuranose, guaijaverin where R_1 is O-arabinopyranose, hyperoside where R_1 is O- β -D-galactopyranose, isohyperoside where R_1 is O- β -D-galactopyranose, isogueritrin where R_1 is O-glucopyranose, multinoside A where R_1 is O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-4)- α -L-rhamnopyranose], multinoside A acetate where R_1 is (6-O-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-(1-4)- α -L-rhamnopyranose, quercitrin where R_1 is O- α -L-rhamnopyranose, rutin where R_1 is O- β -D-rutinose, 25 quercetin-3-O-(2"-O- β -D-glucopyranosyl)- α -L-rhamnopyranoside where R_1 is O-(2"-O- β -D-glucopyranosyl)- α -L-rhamnopyranose, quercetin-3-O-(6"-O-galloyl)-glucopyranoside where R_1 is O-(6"-O-galloyl)-glucopyranose, quercetin-3-O-(6'-O-p-coumaroyl)- β -D-glucopyranosyl-(1-2)- α -L-rhamnopyranoside where R_1 is O-(6'-O-p-coumaroyl)- β -D-glucopyranosyl-(1-2)- α -L-rhamnopyranose, quercetin-3-O-D-glucopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranosyl-(1-4)- α -L-rhamnopyranoside where R_1 is O-D-glucopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranosyl-(1-4)- α -L-rhamnopyranose, quercetin-3-O-(2"-O-6'-O-p-(7"-O- β -D-glucopyranosyl)coumaroyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -L-rhamnopyranoside where R_1 is O-(2"-O-

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

6

6'-O-p-(7"-O-β-D-glucopyranosyl)coumaroyl-β-D-glucopyranosyl]-α-L-rhamnopyranose, quercetin-3-O-[6'-p-coumaroyl-β-D-glucopyranosyl-β-(1-4)-rhamnopyranoside] where R₁ is O-[6'-p-coumaroyl-β-D-glucopyranosyl-β-(1-4)-rhamnopyranose], quercetin-3-O-[α-L-rhamnopyranosyl(1-2)-α-L-rhamnopyranosyl-(1-6)-β-D-glucopyranoside] where R₁ is O-[α-L-rhamnopyranosyl(1-2)-α-L-rhamnopyranosyl-(1-6)-β-D-glucopyranose], quercetin-3-O-[α-rhamnopyranosyl(1-4)-α-L-rhamnopyranosyl(1-6)-β-D-galactopyranoside] where R₁ is O-[α-rhamnopyranosyl(1-4)-α-L-rhamnopyranosyl(1-6)-β-D-galactopyranose], quercetin-3-O-[α-rhamnopyranosyl(1-2)]-[β-glucopyranosyl-(1-6)]-β-D-galactopyranoside where R₁ is O-[α-rhamnopyranosyl(1-2)]-[β-glucopyranosyl-(1-6)]-β-D-galactopyranose, quercetin-3-O-[α-rhamnopyranosyl-(1-4)-α-rhamnopyranosyl-(1-6)-β-galactopyranoside] where R₁ is O-[α-rhamnopyranosyl-(1-4)-α-rhamnopyranosyl-(1-6)-β-galactopyranose], quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1-2)-β-D-galactopyranoside where R₁ is O-α-L-rhamnopyranosyl-(1-2)-β-D-galactopyranose, quercetin-3-O-β-D-diglucofuranoside where R₁ is O-β-D-diglucofuranose, quercetin-3-O-β-D-galactoside-2"-gallate where R₁ is O-β-D-galactoside-2"-gallate, quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside-(1-6)-β-D-galactopyranoside where R₁ is O-β-D-glucopyranoside-(1-6)-β-D-galactopyranose, quercetin-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1-3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1-6)-β-D-galactopyranoside where R₁ is O-β-D-glucopyranosyl-(1-3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1-6)-β-D-galactopyranose, quercetin-3-O-β-D-glucuronide where R₁ is O-β-D-glucuronide, quercetin-3-O-β-D-xylopyranoside where R₁ is O-β-D-xylopyranose, quercetin-3-O-diglucofuranoside where R₁ is O-diglucofuranose, quercetin-3-O-gentiobioside where R₁ is O-gentiobiose, quercetin-3-O-glucopyranosylgalactopyranoside where R₁ is O-glucopyranosylgalactopyranose, quercetin-3-O-neohesperidoside where R₁ is O-neohesperidose, quercetin-3-O-sophoroside where R₁ is O-sophorose, quercetin-3-gentiotrioside where R₁ is gentiotriose, quercetin-3-methyl ether where R₁ is OCH₃, quercetin-3-rhamnogentiobioside

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

7

where R_1 is rhamnoglucose, quercetin-3-rhamnoglucoside where R_1 is rhamnoglucose, and quercetin-3-sulfate where R_1 is sulfate; (ii) a derivative group of the formula I wherein R_1 is -OH, three functional groups out of R_2 to R_5 are -OH, and the rest one functional group varies, includes isorhamnetin where R_1 is OCH_3 , quercimeritrin where R_2 is $O-\beta$ -D-glucopyranose, rhamnetin where R_3 is OCH_3 , quercetin-5- $O-\beta$ -D-glucopyranoside where R_2 is $O-\beta$ -D-glucopyranose, quercetin-7- $O-\beta$ -D-glucuronopyranoside where R_3 is $O-\beta$ -D-glucuronopyranose, and spireaoside where R_5 is O-glucose; (iii) a derivative group of the formula I wherein three functional groups out of R_1 to R_5 are OH and the rest two functional groups vary, includes rhamnazin where R_3 and R_4 are OCH_3 , quercetin-3',4'-di-methyl ether where R_4 and R_5 are OCH_3 , quercetin-3,3'-dimethyl ether where R_1 and R_4 are OCH_3 , quercetin-3,7-dimethyl ether where R_1 and R_3 are OCH_3 , quercetin-3-O-[2"-O-(6"-O-p-coumaroyl)- β -D-glucopyranosyl]- α -L-rhamnopyranosyl-7-O- β -D-glucopyranoside where R_1 is O-[2"-O-(6"-O-p-coumaroyl)- β -D-glucopyranosyl]- α -L-rhamnopyranose and R_3 is $O-\beta$ -D-glucopyranose, quercetin-3-O-[2"-O-6"-O-p-(7"-O- β -D-glucopyranosyl)coumaroyl]- β -D-glucopyranosyl]- α -L-rhamnopyranoside-7-O- β -D-glucopyranoside where R_1 is O-[2"-O-6"-O-p-(7"-O- β -D-glucopyranosyl)coumaroyl]- β -D-glucopyranosyl]- α -L-rhamnopyranose and R_3 is $O-\beta$ -D-glucopyranose, quercetin-3-O-rutinoside-7-O- β -D-glucopyranoside where R_1 is O-rutinoside and R_3 is $O-\beta$ -D-glucopyranose, quercetin-3-O- α -L-arabinopyranosyl-7-O- β -D-glucopyranoside where R_1 is O- α -L-arabinopyranosyl and R_3 is $O-\beta$ -D-glucopyranose, quercetin-7-O- β -D-glucopyranoside-3-O-sophoroside where R_1 is O-sophorose and R_3 is $O-\beta$ -D-glucopyranose, quercetin-3-O-galactopyranosyl-7-O-diglucopyranoside where R_1 is O-galactopyranose and R_3 is O-glucopyranose, quercetin-3-O-glucopyranosyl-7-diglucopyranoside where R_1 is O-glucopyranose and R_3 is O-glucopyranose, quercetin-3,7-diglucopyranoside where R_1 is glucopyranose and R_3 is glucopyranose, quercetin-3-gentiobiosyl-7-glucopyranoside

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

8

- where R_1 is gentiobiose and R_2 is glucopyranose, and quercetin-3,4'-di-O- β -D-glucopyranoside where R_1 and R_2 are O- β -D-glucopyranose; and (iv) a derivative group of the formula I wherein more than three functional groups vary,
- 5 includes quercetin-3,4',7-trimethyl ether where R_1 , R_2 and R_3 are OCH_3 , and R_4 and R_5 are OH, and quercetin-3,3',4',7-tetramethyl ether where R_1 , R_3 , R_4 and R_5 are OCH_3 , and R_2 is OH.
- 10 Quercetin having same OH groups in R_1 to R_5 of the above general formula(I) is a phenolic compound found in over 4000 kinds of plants in nature and is known as one of the phytoestrogens. It has a molecular formula of $C_{15}H_{10}O_7$ with resonance structures and a molecular weight of 302.33
- 15 g/mole and also known as vitamin P following the chemical structure identification in 1936. Quercetin is a rutin, a glycoside wherein sugar is linked via β -linkage and widely distributed in plants such as clover flower, pollen of common ragweed, and shell and stem of various plants, as
- 20 well as in onion, kale, broccoli, lettuce, tomato, and apple. Quercetin has been verified not only to play an important role in maintenance of capillary wall integrity and capillary resistance(see: Gabor et al., *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular, and Medical Properties*, 280: 1-15, 1988; Havsteen
- 25 et al., *Biochemical Pharmacology*, 32:1141-1148, 1983) but also to have antioxidation activity, vitamin P activity, ultraviolet absorbing activity, antihypertensive activity, antiarrhythmic activity, antiinflammatory activity,
- 30 antiallergic activity, anticholesteremic activity, suppressive activity on liver toxicity, and therapeutic effect on infertility, thus, it may be expected to use quercetin widely in foods, medical and pharmaceutical products, and cosmetics. However, there has been no report
- 35 on the use of quercetin for prevention and treatment of osteoporosis.

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

9

The therapeutic agent for osteoporosis of the invention comprising an active ingredient of quercetin derivative is illustrated below.

5 In order to search for the effects of quercetin derivatives on proliferation of osteoblasts and osteoclasts, the present inventors compared the effect of quercetin with that of phytoestrogen genistein which is known to be an effective agent for treatment of osteoporosis, and have
10 found that quercetin has superior effects to genistein for activation of osteoblast proliferation, increase of alkaline phosphatase activity, and inhibition of osteoclast proliferation.

15 Furthermore, in ovariectomized rats, administration of quercetin derivatives has been found not to bring about changes in hormone level, proving that quercetin is a safe agent not causing uterine hypertrophy, an adverse side effect of estradiol which is being used as a therapeutic
20 agent for osteoporosis currently. Also, quercetin derivatives were shown to be more effective than estradiol on increase of trabecular bone area of tibia which is apt to drastic change in trabecular bone area, and to have no adverse effect on hematopoietic function and immune system.

25 Therefore, quercetin derivatives of the invention, based on above results, have been found not only to have superior effects to currently using phytoestrogen genistein for activation of osteoblast proliferation and inhibition
30 of osteoclast proliferation but also to have little side effects, bring about little change in hormone level and have no adverse effect on hematopoietic function and immune system, substantiating the use of quercetin derivatives as a therapeutic or preventive agent for osteoporosis.

35

Formulation

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

10

The said quercetin derivatives having superior effect on treatment of osteoporosis may be mixed with pharmaceutically acceptable excipients including binders such as polyvinylpyrrolidone, hydroxypropylcellulose, etc.,
5 disintegrating agents such as calcium carboxymethylcellulose, sodium glycolate starch, etc., diluting agents such as corn starch, lactose, soybean oil, crystalline cellulose, mannitol, etc., lubricating agents such as magnesium stearate, talc, etc., sweeteners such as
10 sucrose, fructose, sorbitol, aspartame, etc., stabilizing agents such as sodium carboxymethylcellulose, α - or β -cyclodextrin, vitamin C, citric acid, white wax, etc, preservatives such as paraoxymethylbenzoate, paraoxypropylbenzoate, sodium benzoate, etc., and aromatics
15 such as ethylvanillin, masking flavor, flavonomenthol, herb flavor, etc. to prepare pharmaceutical formulations for oral or parenteral administration such as tablets, capsules, soft capsules, liquids, ointments, pills, powders, suspensions, emulsions, syrups, suppositories or injections.
20 Also, to augment efficacy of prevention and treatment of osteoporosis, calcium or vitamin D₃ may be added to the formulations. For parenteral administration of the pharmaceutical preparation of the invention, subcutaneous, intravenous, intramuscular or intraperitoneal injection may
25 be employed. For parenteral administration, quercetin derivative may be mixed with stabilizer or buffer in water to prepare solution or suspension which can be produced as single-dose formulations of ampule or vial.

30 Dosage

The effective amount of quercetin in the therapeutic agent for osteoporosis of the invention is 2 to 20mg/kg, preferably 8 to 12mg/kg, which may be administered to the
35 patient more than once a day depending on the patient's age, gender, degree of seriousness, way of administration, or purpose of prevention.

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

11

Safety

The toxicity of the quercetin derivatives of the invention has been reported in the literature (see: M. Sullivan et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 77:269, 1951) for the cases of oral administration and intraperitoneal administration to the mice, and LD₅₀ of orally administered quercetin was not less than 160mg/kg, approving that quercetin is safe. In the present invention, liver, kidney, brain, uterus, skin and tibia were examined for the side effect of quercetin, which revealed that the weight of liver, kidney, brain, skin and tibia was not affected, moreover, uterine hypertrophy, a side effect of currently used therapeutic agents, was not observed with quercetin, proving that quercetin derivative as a hormone preparation can be used safely as a therapeutic agent for osteoporosis.

The present invention is further illustrated in the following examples, which should not be taken to limit the scope of the invention.

Example 1: Effect of quercetin on osteoblast proliferation

To analyse the effect of quercetin on osteoblast proliferation, human osteoblast-like cell line Saos-2 was employed and a phytoestrogen genistein was employed as a comparative agent which has been intensively studied as a therapeutic agent for osteoporosis.

Example 1-1: Selection and culture of osteoblasts

Saos-2 cell line which has similar properties to osteoblasts was obtained from Korean Cell Line Bank affiliated to the Cancer Research Institute of School of Medicine, Seoul National University.

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

12

Saos-2 cells were seeded in a RPMI 1640 medium (Gibco BRL, U.S.A.) supplemented with 10% (v/v) FBS, 100 unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and grown to form a monolayer in an incubator at 37°C under an environment of 5% (v/v) CO₂ and saturated humidity. The culture was fed with fresh medium 2 to 3 times a week and subcultured once a week using 0.25% (w/v) trypsin.

10 Example 1-2: Cell proliferation depending on concentrations of the agents

Saos-2 cells were distributed into a 96-well plate (20,000 cells/well) and quercetin in 1% DMSO was added to a final concentration of 10⁻¹ to 10⁻⁵ mg/ml, 6 wells per each concentration. As a control group, cells without quercetin were used, and as a comparative group, the cells treated with various concentrations of genistein, being studied as a therapeutic agent for osteoporosis, were used.

20 Cells were grown in an incubator at 37°C for 3 days and incubated 4 more hours under the same condition after adding MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Triazolyl Blue) to a concentration of 0.05 mg/ml. Then, purple colored formazan

25 formed in proportion to the number of viable cells was dissolved in DMSO and measured OD at 550 nm employing ELISA reader.

Cell proliferation rate (%) was evaluated by calculating the ratio of the OD of quercetin added well to the OD of control well, wherein, average value of ODs from 6 wells treated with the same concentration of quercetin was employed (see: Table 1).

35 cell proliferation rate (%) = ((average value of OD at 550 nm of quercetin-treated wells - average value of OD at 550 nm

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

13

of empty wells)/average value of OD at 550nm of control wells X100

Example 1-3: Analysis of alkaline phosphatase (ALP) activity

Since osteoblasts have cell specific alkaline phosphatase activity, the effect of quercetin of the invention on ALP activity in osteoblasts was evaluated as follows: the number of cells, concentration of tested agent, and culture condition were same as those used in MTT experiment of Example 1-2, and cells were harvested after 3 day-incubation. Genistein was used as a comparative agent. ALP activity was evaluated by analysing changes of OD at 405nm result from hydrolysis of p-nitrophenylphosphate to p-nitrophenol and phosphate (see: Table 1).

Table 1: Effect of quercetin on osteoblast proliferation

Concentration (mg/ml)	Quercetin (% of control group)		Genistein (% of control group)	
	MTT assay	ALP activity	MTT assay	ALP activity
Control group	100.0 ± 2.5	100.0 ± 1.6	100.0 ± 0.6	100.0 ± 7.3
1 × 10 ⁻⁹	93.1 ± 0.8*	98.1 ± 0.0	91.3 ± 0.6*	106.1 ± 6.4
1 × 10 ⁻⁸	93.9 ± 0.8	104.4 ± 3.9	96.9 ± 2.7	101.5 ± 8.8
1 × 10 ⁻⁷	98.6 ± 1.0	101.2 ± 3.1	95.9 ± 1.6	109.3 ± 9.6
1 × 10 ⁻⁶	96.0 ± 1.0	127.2 ± 3.5**	90.5 ± 0.9**	103.8 ± 8.7
1 × 10 ⁻⁵	95.8 ± 1.1	116.5 ± 3.7	97.3 ± 1.6	113.5 ± 7.3
1 × 10 ⁻⁴	96.5 ± 0.8	113.5 ± 2.3	95.7 ± 0.7	121.1 ± 6.2
1 × 10 ⁻³	98.3 ± 0.8	107.3 ± 1.5	85.5 ± 1.1**	98.8 ± 6.9
1 × 10 ⁻²	108.6 ± 2.2**	106.1 ± 4.3	66.2 ± 2.8**	62.3 ± 3.4

20 *: p < 0.05

**: p < 0.01

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

14

As shown in Table 1 above, in the cell proliferation experiment using MTT method, the cells treated with various concentrations of quercetin in the range of 1×10^{-9} to 1×10^{-3} mg/ml did not show any difference from the control cells which were not treated with the agent, while quercetin showed maximum cell proliferation effect of 109% of control cell proliferation at a concentration of 1×10^{-7} mg/ml ($p < 0.01$). On the other hand, genistein, a comparative agent, showed 91% ($p < 0.05$) at a concentration of 1×10^{-3} mg/ml, 90.5% ($p < 0.01$) at a concentration of 1×10^{-6} mg/ml, 86% ($p < 0.01$) at a concentration of 1×10^{-3} mg/ml, and 66% ($p < 0.01$) at a concentration of 1×10^{-2} mg/ml, implying that genistein exert rather inhibitory effect than stimulatory effect on proliferation of osteoblasts.

In the experiment of assaying ALP activity, quercetin showed its maximum ALP activation effect of 127% ($p < 0.01$) of control ALP activity at a concentration of 1×10^{-6} mg/ml, while genistein showed its maximum ALP activation activity of 121% at a concentration of 1×10^{-6} mg/ml, indicating that the ALP activation effect of quercetin of the invention is about 100 fold higher than that of genistein. Therefore, quercetin of the invention is more effective on the stimulation of osteoblast proliferation and activation of ALP activity than genistein which is studied intensively as a therapeutic agent for osteoporosis in recent years.

Example 2: Effect of quercetin on osteoclast proliferation

To examine whether quercetin have inhibitory effect on the proliferation of osteoclasts, experiments were carried out as followings.

Example 2-1: Selection and culture of osteoclasts

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

15

ICR mice (Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejeon, Korea) were fed with calcium deficient diet (ICN Biomedicals, Inc., Ohio, U.S.A.) for 4 weeks to activate osteoclasts. The right and left tibiae and femurs of the calcium deficient rats were removed avoiding contamination of surrounding muscle tissues. Femurs and right and left tibiae, classified on the clean bench and kept on ice separately, were added into the α -MEM containing 100 μ g/ml streptomycin and then vigorously shaken respectively to extract osteoclasts into the medium. After kept on ice for 5 minutes, the cell suspension was centrifuged at 800xg for 3 minutes and the cell pellet was resuspended in a α -MEM nutrient medium supplemented with 10% FBS, 100 μ g/ml streptomycin and 100 unit/ml penicillin. The cell suspension was distributed into wells of a 24-well plate at a cell number of 3.5×10^5 /well.

Example 2-2: Cell proliferation depending on concentrations of quercetin

To the osteoclasts obtained in Example 2-1 above, quercetin was added to yield concentrations of 1×10^{-8} to 1×10^{-4} mg/ml. On day 2, the cells were subjected to tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining using a commercially available kit (Sigma Chemical Co., U.S.A.), followed by counting of osteoclasts which are TRAP-positive multinucleated cells (MNC), judged by more than three nuclei in a cell stained red (see Table 2).

Table 2: Effect of quercetin on osteoclast proliferation

Concentration (mg/ml)	Number of osteoclast (% of control group)
Control group	100.0 \pm 8.1
1×10^{-8}	100.9 \pm 1.8
1×10^{-4}	96.8 \pm 2.7
1×10^{-4}	89.6 \pm 3.2

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

16

1×10^{-3}	$61.1 \pm 4.1^*$
1×10^{-2}	$24.7 \pm 5.7^{**}$

*: $p < 0.05$,**: $p < 0.01$

As shown in Table 2 above, while quercetin at concentrations between 1×10^{-8} to 1×10^{-4} mg/ml exerted little inhibitory effect on the osteoclast proliferation, the cell numbers at quercetin concentration of 1×10^{-3} mg/ml and 1×10^{-2} mg/ml was 61% ($p < 0.05$) and 25% of control cell number respectively, showing that quercetin exerted remarkable inhibitory effect on the osteoclast proliferation.

Based on the results of Examples 1 and 2, it was clearly demonstrated that quercetin is a potential therapeutic agent for osteoporosis which exerts stimulatory effect on osteoblast proliferation and inhibitory effect on osteoclast proliferation at a concentration of 10^{-2} mg/ml.

Example 3: Effect of quercetin on ovariectomized rats

Female SD (Sprague-Dawley) rats, a model animal for type 1 osteoporosis occurring after menopause were employed for evaluating pharmacological effectiveness of quercetin. Female rats (10 weeks old) weighing 200 to 300g, obtained from the Korea Research Institute of Chemical Technology were employed as experimental animals. Experiment was carried out by the procedure which comprises removing ovary, administration of agents to the each group of rats, and at certain days after ovariectomy, the rats were sacrificed and subjected to analyses including measurement of body weight, examination of internal organs, measurement of trabecular bone area, complete blood count, and biochemical analyses of plasma.

Example 3-1: Ovariectomy and administration of the agents

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

17

Rats of control group and test group, except Sham group(normal group), were ovariectomized as follows: a female rat was systemic anesthetized by intramuscular injection with 5mg/100g Ketamin(Yuhan Corporation, Korea) and 1mg/100g Xylazine(Beyer Korea, Korea) to the femur muscle of left and right hind limbs, and then, fur of lower abdominal region was shaved, operation area was sterilized with Potadin liquid(Iodine, Szmil Pharm. Co., Ltd., Korea) in lying position, about 2cm of abdominal skin, abdominal muscle, and peritoneum was cut in the middle under aseptic condition, ovary was exposed using sterilized forceps, followed by removal of both left and right ovaries after ligaturing of oviducts using silk threads. Subsequently, 0.3ml of antibiotics(Sulfaforte[®]-4, Yoonee Chemical Co., Ltd., Korea) was injected intraperitoneally to prevent infection, and then peritoneum, abdominal muscle and skin were sutured with silk threads or nylon threads.

The Sham group, animals operated upon for the surgery as in the ovariectomized rats except for removing ovary, were employed to compare the changes caused solely by ovariectomy in control group which were ovariectomized but no agent was administered. Control group was employed to compare the changes caused by administration of agents in test group which were ovariectomized and administered with testing agents.

When test agents were administered, for a certain period of time before and after administration, 1.5ml of blood was sampled from tail vein using a catheter(B.D Co.: 24G) and subjected to complete blood count(Coulter Co.: JT) and biochemical analyses of plasma(Crone Co.: Airon[®] 200). During autopsy, blood was sampled from caudal venae cavae and subjected to the analyses above. And then, each sample was frozen to store for measurement of trabecular bone area of femur and examination of internal organs.

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

18

One week after operation, rats in Sham group and control group were intraperitoneally injected with 10% Tween 80 solution, the rats in E2 group were injected with 17 β -estradiol at a concentration of 1 μ g/kg/day, the rats in test group were injected with quercetin or genistein at a concentration of 10mg/kg/day for 9 weeks, and the rats in each group were subjected to body weight measurement once a week. During the period of administration, blood was sampled once a week. After 9-week administration, entire blood was withdrawn with heparin treatment. Following complete blood count(CBC), the blood was centrifuged at 3,000rpm for 20 minutes to obtain plasma which was stored at -70°C until use. For measurement of bone mineral density, the lumbar spine L5 and L6, and right tibia were removed and stored separately in 4%(v/v) formalin solution.

Example 3-2: Body weight change depending on quercetin administration

The body weight of the rats in Sham group, E2 group treated with 17 β -estradiol and test group treated with quercetin or genistein respectively, was measured once a week for 10 weeks after operation(see: Table 3).

Table 3: Measurement of body weight changes depending on drug administration

Time (week)	Weight(g)				
	Control group	Sham group	E2-treated group	Quercetin-treated group	Genistein-treated group
Before operation	219.39 \pm 4.05	220.70 \pm 4.63	228.51 \pm 8.11	221.87 \pm 7.57	217.55 \pm 7.24
1 after operation	244.98 \pm 3.00	231.51 \pm 4.68	249.50 \pm 8.16	241.73 \pm 4.83	242.12 \pm 3.96

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

19

2 after operat ion	274.29±3 .68**	236.40±5.0 6**	264.97±8.3 5	271.70±5. 79**	270.00±8.0 5**
3 after operat ion	299.37±3 .74**	245.56±4.7 9**	279.87±8.1 5**	295.00±3. 89**	296.20±7.6 8**
4 after operat ion	315.20±3 .84**	248.96±5.0 2**	292.83±9.2 5**	312.07±5. 95**	310.80±7.8 0**
5 after operat ion	320.30±4 .83**	255.43±5.1 4**	296.96±9.4 4**	320.25±6. 76**	317.29±7.9 3**
6 after operat ion	329.03±5 .05**	261.49±6.4 6**	304.49±8.4 0**	326.68±6. 73**	327.19±8.3 1**
7 after operat ion	337.39±5 .93**	264.78±5.5 3**	313.04±8.7 3**	333.25±7. 61**	332.80±9.2 3**
8 after operat ion	340.01±6 .60**	268.16±5.4 0**	315.87±8.3 2**	335.09±6. 65**	336.38±9.0 1**
9 after operat ion	347.96±7 .58**	273.81±4.5 4**	319.95±9.4 7**	343.02±6. 96**	342.71±8.2 6**
10 after operat ion	356.73±7 .13**	275.22±4.3 0**	320.00±5.9 0**	346.27±6. 39**	347.23±7.5 7**

*: p<0.05, **: p<0.01, compared with before operation

#: p<0.05, ##: p<0.01, compared with control group

As shown in Table 3, body weight of Sham group began to increase 3 weeks (p<0.05) after operation and that of control group began to increase 2 weeks (p<0.01) after operation. That is, control group showed rapid increase of body weight compare to Sham group, and such increase of body weight was slowed down after administration of estradiol, and E2 group showed slower increase of body

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

20

weight compare to control group ($p < 0.05$) 20 weeks after operation. Meanwhile, the test group administered with phytoestrogen quercetin or genistein at a concentration of 10mg/kg/day respectively showed rapid increase of body weight even after removing ovary similar to control group. Thus, quercetin administration was found not to bring about meaningful changes in hormone level in the body.

Example 3-3: Changes in the weight of internal organ by quercetin.

To find out quercetin effect on internal organ of test animal, liver, kidney, brain, uterus, skin, and tibia were removed from the test animals administered with test agents for 9 weeks after operation and wet weight of each organ was measured (see: Table 4).

Table 4: Changes in the weight of internal organ after drug administration

	Control group	Sham group	E2-treated group	Quercetin-treated group	Genistein-treated group
Liver (g)	9.84±0.3 3	9.52±0.48	9.22±0.4 3	9.07±0.30	10.03±0.36
Kidney (g)	1.95±0.0 9	1.91±0.05	1.85±0.0 9	1.84±0.05	1.83±0.03
Brain (g)	2.03±0.0 4	1.93±0.02	1.98±0.0 5	1.98±0.04	1.98±0.03
Tibia (g)	0.559±0.025	0.514±0.013	0.504±0.019	0.554±0.01 9	0.537±0.008
Skin (mg)	193±7	169±8	193±6	197±11	188±9
Uterus (mg)	79±4	450±29**	279±10**	85±6	106±3

** : $p < 0.01$

As shown in Table 4, in case of the weight of liver, kidney, brain, tibia, and skin, normal Sham group, ovariectomized control group and test group did not show

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

21

differences among groups. However, in case of weight of uterus which is affected by the estrogen secreted from ovary, ovariectomized control group showed significant decrease($p<0.01$) compare to Sham group, and administration of E2 after removing ovary suppressed atrophy of uterus($p<0.01$) compare to control group. Administration of phytoestrogen quercetin or genistein did not give rise to change in weight of uterus, on the other hand, E2 which is a currently used therapeutic agent for osteoporosis showed side effect such as uterine hypertrophy, showing that quercetin can be used safely as a therapeutic agent for osteoporosis without adverse side effect.

Example 3-4: Changes in the trabecular bone area by quercetin

Trabecular bone area(TBA) of lumbar and tibia removed from the rats of each group which was treated with various agents for 9 weeks were measured as follows: that is, using a digitalizer of quantitative image analysis system(Wild Leitz Co.), image of each trabecula was obtained on computer monitor by drawing a contour of the trabecula, and then, using a computer, calculated were average areas of trabeculae within a rectangle of $2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ area wherein the width is about 2/3 of the length of growth plate which located underneath of growth plate at proximity of tibia. Also, following the number of trabeculae within the rectangle were obtained, average area was multiplied by the number of trabeculae to obtain trabecular bone area of each sample bone, which was analyzed statistically(see: Table 3).

Table 3: Changes in the trabecular bone area of tibia depending on drug administration

	TBA ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)	Change Rate(%)
Control group	34.62 \pm 2.62	100.00 \pm 7.55

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

22

Sham group	85.55 ±5.31**	247.07 ±15.33**
E2-treated group	51.40 ±2.28	148.46 ±6.59
Quercetin-treated group	55.52 ±7.68*	160.34 ±22.17*
Genistein-treated group	47.65 ±2.07	137.62 ±5.98

*: p<0.05,

**: p<0.01

As shown in Table 5, in case of tibia, the TBA of control group was $34.62 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ which is a significantly decreased value compare to normal Sham group of $85.55 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ (p<0.01), showing that osteoporosis have occurred in control group, and such decreased TBA was increased again by treatment with E2, quercetin or genistein to 148%, 160%, and 138% of TBA of control group respectively, especially in case of quercetin, remarkable increase of TBA was monitored (p<0.05).

TBA of lumbar removed from the animal treated with test agents for 9 weeks were measured employing the same method above (see: Table 6).

Table 6: Changes in the trabecular bone area of lumbar depending on drug administration

	TBA ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)	Change Rate (%)
Control group	67.53 ±2.31	100.00 ±3.42
Sham group	93.70 ±5.29**	138.76 ±7.84**
E2-treated group	89.16 ±2.83**	132.04 ±4.19**
Quercetin-treated group	87.38 ±4.53*	129.40 ±6.71*
Genistein-treated group	86.58 ±3.00*	128.23 ±4.45*

*: p<0.05,

**: p<0.01

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

23

As shown in Table 6, in case of lumbar, the TBA of control group was $57.53 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ which is a decreased value compare to Sham group of $93.70 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ ($p < 0.01$), but, such decreased TBA was increased again by treatment with E2, quercetin or genistein to 132% ($p < 0.01$), 129% ($p < 0.05$) and 128% ($p < 0.05$) of TBA of control group respectively, showing that these test agents exerted suppressing effect on decrease of TBA caused by ovariectomy. Especially, quercetin showed more significant increase of TBA in tibia which is apt to drastic change in TBA than E2 a currently used therapeutic agent for osteoporosis, showing that quercetin is a more effective therapeutic agent not causing uterine hypertrophy which is an adverse side effect caused by E2.

Example 3-5: Complete blood count

Complete blood count which reflects the condition and abnormality of the body was measured to find out abnormality in test animals caused by administration of agents. That is, to find out changes in hematopoiesis of test rats, measured were red blood cell (RBC) count, concentration of hemoglobin (Hb) and hematocrit (Ht) of blood samples obtained from the rats prior to operation and the rats 10 weeks after administering agents following operation, and to find out changes in immune system such as inflammation and necrosis of tissues, measured were white blood cell count, lymphocyte count, monocyte count, and granulocyte count (see: Table 7).

35

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

24

Table 7: Changes in Complete blood count depending on drug administration

	Operation	Control group	Sham group	E2-treated group	Quercetin-treated group	Genistein-treated group
Red blood cell (RBC) count ($\times 10^6$ cells/ μ l)	before	7.36 \pm 0.11	7.19 \pm 0.11	7.33 \pm 0.13	7.29 \pm 0.15	7.32 \pm 0.13
	after	7.08 \pm 0.09	6.75 \pm 0.24	6.97 \pm 0.14	7.13 \pm 0.15	7.17 \pm 0.13
Concentration of hemoglobin (Hb) (g/dl)	before	16.09 \pm 0.21	15.75 \pm 0.20	15.85 \pm 0.24	16.00 \pm 0.30	15.82 \pm 0.27
	after	14.53 \pm 0.20**	14.09 \pm 0.48**	14.34 \pm 0.25**	14.84 \pm 0.22*	14.70 \pm 0.22**
Hematocrit (Ht) (%)	before	43.34 \pm 0.48	43.09 \pm 0.61	43.11 \pm 0.55	43.62 \pm 0.83	42.76 \pm 0.65
	after	39.48 \pm 0.60**	38.39 \pm 0.24**	38.96 \pm 0.72**	41.10 \pm 0.68*	40.66 \pm 0.66*
White blood cell count ($\times 10^3$ cells/ μ l)	before	26.13 \pm 4.63	25.61 \pm 3.64	23.14 \pm 1.50	20.28 \pm 3.77	27.30 \pm 4.85
	after	21.66 \pm 2.85	12.74 \pm 2.88*	13.26 \pm 0.97**	18.50 \pm 7.60	21.50 \pm 2.53
Lymphocyte count ($\times 10^3$ cells/ μ l)	before	22.14 \pm 4.49	18.04 \pm 2.38	17.80 \pm 1.72	16.78 \pm 3.52	19.68 \pm 4.52
	after	21.20 \pm 9.00	10.20 \pm 2.88	10.23 \pm 0.96*	15.00 \pm 7.71	15.25 \pm 3.21
Monocyte count ($\times 10^3$ cells/ μ l)	before	1.02 \pm 0.18	0.73 \pm 0.17	1.44 \pm 0.29	0.65 \pm 0.07	0.77 \pm 0.09
	after	1.10 \pm 0.21	0.93 \pm 0.14	1.02 \pm 0.24	1.00 \pm 0.20	0.80 \pm 0.19
Granulocyte count ($\times 10^3$ cells/ μ l)	before	2.99 \pm 0.44	2.83 \pm 0.39	3.67 \pm 0.40	2.80 \pm 0.30	2.23 \pm 0.10
	after	2.52 \pm 0.21	1.93 \pm 0.26	1.99 \pm 0.25*	2.43 \pm 0.12	2.38 \pm 0.37

*: $p < 0.05$,5 **: $p < 0.01$

As shown in Table 7, RBC count did not show any changes before and after operation in all groups, and concentration of hemoglobin and hematocrit were decreased after operation in all groups. White blood cell count did not show any changes before and after operation in quercetin or genistein treated groups, but decreased in Sham group and E2 group after operation. Also, lymphocyte

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

25

and granulocyte count showed rapid decrease in E2 group only, and monocyte count was stayed same in entire groups. Thus, quercetin was found to be a safe agent not disturbing hematopoiesis and immune system of the body.

5

Example 3-6: Biochemical changes of plasma by quercetin

Since blood reflects the condition of body, safety of quercetin in the body was evaluated by measuring biochemical parameters: that is, blood samples were obtained from the rat prior to operation, one week after operation, and 10 weeks after operation, and measured were levels of alkaline phosphatase (ALP), calcium, inorganic phosphate, blood urea nitrogen (BUN), creatinin, total cholesterol, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol (see: Table 8).

Table 8: Changes in biochemical parameters in plasma depending on drug administration

	Operation	Control group	Sham group	E2-treated group	Quercetin-treated group	Genistein-treated group
Concentration of ALP (U/dL)	before	262.75±23.31	245.59±22.05	196.01±28.34	232.83±20.27	208.06±19.72
	1 week after	265.75±22.78	215.18±20.22	195.24±27.87	226.67±23.20	212.10±17.92
	10 weeks after	198.31±14.64	135.09±10.64***	123.59±22.18	156.42±13.08	127.14±9.95***
Concentration of calcium (mg/dL)	before	10.48±0.43	10.57±0.55	10.86±0.40	10.73±0.48	10.61±0.49
	1 week after	9.98±0.34	10.35±0.17	10.03±0.18	8.37±0.24**	8.97±0.29*
	10 weeks after	10.83±0.15	11.79±0.23*	11.20±0.16*	10.26±0.13*	10.44±0.22*
Concentration of inorganic phosphate (mg/dL)	before	6.52±0.39	6.87±0.62	6.90±0.52	6.79±0.66	7.18±0.48
	1 week after	6.27±0.31	6.59±0.20	6.13±0.12	6.21±0.18	6.47±0.16
	10 weeks after	4.95±0.41**	6.09±0.47	5.51±0.45	5.73±0.58	5.62±0.25*

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

26

Concentration of blood urea nitrogen (BUN) (mg/dL)	before	18.56±0.9 2	17.13±1.1 1	18.36±1.0 1	17.05±0.6 0	16.82±0.60
	1 week after	18.31±0.7 0	16.75±0.5 8	17.79±0.7 6	18.06±0.8 8	18.26±0.94
	10 weeks after	21.20±1.0 6	19.73±0.8 4	19.98±0.8 6	18.19±0.4 1	18.51±0.86
Concentration of creatinine (mg/dL)	before	0.54±0.05	0.56±0.06	0.55±0.05	0.57±0.05	0.51±0.04
	1 week after	0.54±0.05	0.62±0.04	0.57±0.03	0.59±0.01	0.64±0.02*
	10 weeks after	0.78±0.03 ####	0.80±0.03 ##	0.81±0.03 ####	0.82±0.04 ###	0.82±0.04**
Concentration of total cholesterol (mg/dL)	before	72.66±5.0 0	79.67±1.7 3	76.75±2.8 0	77.55±5.1 3	85.51±5.45
	1 week after	93.32±4.7 5	79.75±2.4 6	95.53±4.1 7	85.84±3.8 2	91.56±3.65
	10 weeks after	120.44±5.2 21####	88.60±4.8 7**	115.05±5.7 75###	107.73±2.2 24**	121.07±6.5 3**
Concentration of HDL-cholesterol (mg/dL)	before	53.78±2.7 7	52.33±2.6 1	52.30±2.0 1	53.38±3.1 4	61.12±3.57
	1 week after	46.20±0.6 2	41.69±1.4 7	49.03±3.3 7	42.49±4.8 5	35.26±1.92*
	10 weeks after	29.60±2.6 3###	22.32±2.4 9####	24.94±2.7 2###	25.13±2.7 8**	29.27±1.98*
Concentration of LDL-cholesterol (mg/dL)	before	18.88±3.1 3	26.63±3.0 4	24.49±1.6 3	24.17±3.1 3	24.39±3.63
	1 week after	42.80±6.4 1**	36.30±0.6 3	40.50±6.1 7	40.85±4.8 8	60.47±7.04*
	10 weeks after	90.84±4.2 7####	69.29±3.0 5####	88.33±4.7 4####	82.60±4.8 5####	91.80±6.57*

*: p<0.05, **: p<0.01, compared with control group

#: p<0.05, ##: p<0.01, compared with before operation

\$: p<0.05, \$\$: p<0.01, compared with 1 week after operation

5. As shown in Table 8, ALP activity which is directly related to bone metabolism showed tendency of decrease with aging in entire groups, especially, in Sham group and genistein treated group, the rats of 10 weeks after operation showed significant decrease of ALP activity and
- 10 no change in calcium concentration compare to the rats prior to operation and one week after operation. And, the level of inorganic phosphate remarkably decreased in the

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

27

rats of 10 weeks after operation compare to the rats prior to operation in control group and genistein treated group.

While the level of blood urea nitrogen which is related to the protein metabolism and muscle volume was maintained at a proper level in entire groups, the level of creatinin increased in entire groups.

The level of total cholesterol which is known to increase in postmenopause women increased in entire groups, although increase in Sham group was relatively low. While the level of HDL-cholesterol decreased with time in entire groups, the level of LDL-cholesterol increased with time, which were found in normal Sham group as well as ovariectomized groups.

Thus, the quercetin of the invention was found to be an effective therapeutic and preventive agent for osteoporosis.

Example 4: The formulation of the quercetin preparation

20 Example 4-1: Syrup

The syrup formulation containing 2%(w/v) quercetin, its derivatives or pharmaceutically acceptable salts thereof was prepared as follows: quercetin hydrochloride, saccharine and sugar were dissolved in 80g of warm water, cooled down, and then mixed with a solution containing glycerin, saccharine, aromatics, ethanol, sorbic acid and distilled water. Water was added to the mixture prepared above to give 100ml of syrup formulation of quercetin, whose components are as follows:

	quercetin hydrochloride	2g
	saccharine	0.8g
	sugar	25.4g
35	glycerin	8.0g
	aromatics	0.04g
	ethanol	4.0g

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

28

sorbic acid 0.4g
 distilled water a proper quantity

Example 4-2: Tablet

5 The tablet containing quercetin, its derivatives or
 pharmaceutically acceptable salts thereof was prepared as
 follows: 250g of flavonoid derivative of
 quercetin hydrochloride was mixed with 175.9g of lactose,
 10 180g of potato starch, and 32g of colloidal silicate, and
 then 10% (w/v) gelatin solution was added. After
 pulverization, the mixture was passed through a 14-mesh
 sieve, dried, and mixed with 160g of potato starch, 50g of
 talc, and 5g of magnesium stearate to give tablets, whose
 15 components are as follows:

flavonoid derivative of quercetin hydrochloride 250g
 lactose 175.9g
 potato starch 180g
 20 colloidal silicate 32g
 10% (w/v) gelatin solution a proper quantity
 potato starch 160g
 talc 50g
 magnesium stearate 5g

25

Example 4-3: Injection

One gram of flavonoid derivative of
 quercetin hydrochloride, 0.6g NaCl, and 0.1g of ascorbic
 30 acid were dissolved in distilled water to give a final
 volume of 100ml, and then the solution was put into a vial,
 which was sterilized by heating at 100°C for 30 minutes to
 give the injection. The components of the said injection
 are as follows:

35

flavonoid derivative of quercetin hydrochloride 1g
 NaCl 0.6g

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

29

ascorbic acid 0.1g
distilled water a proper quantity

As clearly illustrated and demonstrated above, the
5 present invention provides a therapeutic agent for
osteoporosis comprising an active ingredient of quercetin
derivatives which effectively stimulate osteoblast
proliferation and inhibit osteoclast proliferation. The
quercetin derivatives of the invention can be practically
10 applied for the treatment and prevention of osteoporosis,
since they effectively inhibit osteoclast proliferation and
stimulate osteoblast proliferation more than conventional
therapeutic agents for osteoporosis, and increase
trabecular bone area highly without changing hormone level
15 in body and untoward effects on hematopoietic function and
immune system.

20

25

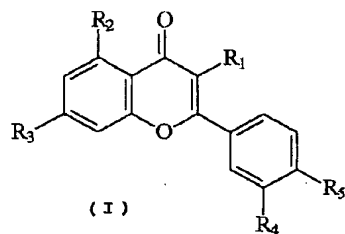
WO 02/17909

PCT/KR01/00368

30

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A therapeutic agent for osteoporosis comprising an active ingredient of quercetin derivatives represented by the following general formula(I) and a pharmaceutically acceptable carrier:



wherein,

- R_1 is gentiobiose, glucopyranose, O-arabinofuranose, O-diglucopyranose, O-galactopyranose, O-galactoside-gallate, O-gentiobiose, O-glucopyranose, O-glucuronide, O-neohesperidose, O-rhamnopyranose, O-rutinose, O-sophorose, O-xylopyranose, OCH_3 , OH, rhamnogentiobiose, rhamnoglucose or sulfate;
- R_2 is OH or O-glucopyranose;
- R_3 is OCH_3 , OH, O-glucopyranose, O-glucuronopyranose or glucopyranose;
- R_4 is OCH_3 or OH; and,
- R_5 is OCH_3 , OH, O-glucopyranose or O-glucose.

2. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1, wherein the quercetin derivatives are compounds represented by general formula(I) whose R_2 , R_3 , R_4 and R_5 are -OH as followings: quercetin, avicularoside, guajaverin, hyperoside, isohyperoside, isoquercitrin, multinoside A, multinoside A acetate, quercitrin, rutin, quercetin-3-O-

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

31

(2"-O-β-D-glucopyranosyl)-α-L-rhamnopyranoside, quercetin-3-O-(6"-O-galloyl)-glucopyranoside, quercetin-3-O-(6"-O-p-coumaroyl-β-D-glucopyranosyl-(1-2)-α-L-rhamnopyranoside), quercetin-3-O-D-glucopyranosyl-(1-6)-β-D-glucopyranosyl-(1-4)-α-L-rhamnopyranoside, quercetin-3-O-(2"-O-6"-O-p-(7"-O-β-D-glucopyranosyl)coumaroyl-β-D-glucopyranosyl)-α-L-rhamnopyranoside, quercetin-3-O-(5"-p-coumaroyl-β-D-glucopyranosyl-β-(1-4)-rhamnopyranoside), quercetin-3-O-(α-L-rhamnopyranosyl(1-2)-α-L-rhamnopyranosyl-(1-6)-β-D-glucopyranoside), quercetin-3-O-(α-rhamnopyranosyl(1-4)-α-L-rhamnopyranosyl(1-6)-β-D-galactopyranoside), quercetin-3-O-(α-rhamnopyranosyl-(1-2))-([β-glucopyranosyl-(1-6)]-β-D-galactopyranoside, quercetin-3-O-(α-rhamnopyranosyl-(1-4)-α-rhamnopyranosyl-(1-6)-β-galactopyranoside), quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1-2)-β-D-galactopyranoside, quercetin-3-O-β-D-diglucopyranoside, quercetin-3-O-β-D-galactoside-2"-gallate, quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside-(1-6)-β-D-galactopyranoside, quercetin-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1-3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1-6)-β-D-galactopyranoside, quercetin-3-O-β-D-glucuronide, quercetin-3-O-β-D-xylopyranoside, quercetin-3-O-diglucopyranoside, quercetin-3-O-gentiobioside, quercetin-3-O-glucopyranosylgalactopyranoside, quercetin-3-O-neohesperidoside, quercetin-3-gentiotrioside, quercetin-3-methyl ether, quercetin-3-rhamnogentiobioside, quercetin-3-rhamnogluccoside, or quercetin-3-sulfate.

3. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1, wherein the quercetin derivatives are compounds represented by general formula (I) whose R₁ is -OH and three functional groups out of R₂, R₃, R₄ and R₅ are -OH as followings: isorhamnetin, quercimeritrin, rhamnetin, quercetin-5-O-β-D-glucopyranoside, quercetin-7-O-β-D-glucuronopyranoside or spireaoside.

4. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1,

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

32

wherein the quercetin derivatives are compounds represented by general formula (I) whose three functional groups out of R_1 , R_2 , R_3 , R_4 and R_5 are -OH as followings: rhamnazin, quercetin-3',4'-di-methyl ether, quercetin-3,3'-dimethyl ether, quercetin-3,7-dimethyl ether, quercetin-3-O-[2"-O-(6"-O-p-coumaroyl)- β -D-glucopyranosyl]- α -L-rhamnopyranosyl-7-O- β -D-glucopyranoside, quercetin-3-O-[2"-O-6"-O-p-(7"-O- β -D-glucopyranosyl) coumaroyl]- β -D-glucopyranosyl]- α -L-rhamnopyranoside-7-O- β -D-glucopyranoside, quercetin-3-O-rutinoside-7-O- β -D-glucopyranoside, quercetin-3-O- α -L-arabinopyranosyl-7-O- β -D-glucopyranoside, quercetin-7-O- β -D-glucopyranoside-3-O-sophoroside, quercetin-3-O-galactopyranosyl-7-O-diglucopyranoside, quercetin-3-O-glucopyranosyl-7-diglucopyranoside, quercetin-3,7-diglucopyranoside, quercetin-3-gentiobiosyl-7-glucopyranoside or quercetin-3,4'-di-O- β -D-glucopyranoside.

5. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1, wherein the quercetin derivative is quercetin-3,4',7-trimethyl ether or quercetin-3,3',4',7-tetramethyl ether.

6. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1, wherein the pharmaceutically acceptable carrier is selected from the group consisting of polyvinylpyrrolidone and hydroxypropylcellulose.

7. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1, wherein the pharmaceutically acceptable carrier is a disintegrating agent selected from the group consisting of calcium carboxymethylcellulose and sodium glycolate starch.

8. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1, wherein the pharmaceutically acceptable carrier is a diluting agent selected from the group consisting of corn starch, lactose, soybean oil, crystalline cellulose and mannitol.

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

33

9. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1,
wherein the pharmaceutically acceptable carrier is a
lubricating agent selected from the group consisting of
5 magnesium stearate and talc.
10. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1,
wherein the pharmaceutically acceptable carrier is a
sweetener selected from the group consisting of sucrose,
10 fructose, sorbitol and aspartame.
11. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1,
wherein the pharmaceutically acceptable carrier is a
stabilizing agent selected from the group consisting of
15 sodium carboxymethylcellulose, α - or β -cyclodextrin,
vitamin C, citric acid and white wax.
12. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1,
wherein the pharmaceutically acceptable carrier is a
20 preservative selected from the group consisting of
paraoxymethylbenzoate, paraoxypropylbenzoate and sodium
benzoate.
13. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1,
25 wherein the pharmaceutically acceptable carrier is an
aromatic selected from the group consisting of
ethylvanillin, masking flavor, flavonomenthol and herb
flavor.
- 30 14. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1,
wherein the therapeutic agent is a pharmaceutical
formulation for oral or parenteral administration selected
from the group consisting of tablets, capsules, soft
capsules, liquids, ointments, pills, powders, suspensions,
35 emulsions, syrups, suppositories and injections.

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

34

15. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1
which further comprises calcium or vitamin D₃.

5

10

15

20

25

30

35

【國際調查報告】

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7 A61K 31/353		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC7: C07D; A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CASLINK; BSPACENT		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 63-156720 A (KISSEI CY.) 29. 06. 88, see the whole document, (Family; none)	1-15
A	WO 95/03293 A (CHINOIN LTD.) 02. 02. 95, see the whole document	1-15
A	JP 60-048924 A (TAKETA LTD.) 16. 05. 85, see the whole document	1-15
A	US 6,040,333 A (SHERRY D.) 21. 03. 00, see the whole document, (Family; none)	1-15
A	Floridi, G. et al., "Retrogen synthesis in human colon cancer epithelial cells", In: J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1999, 71(3-6), 223-230.	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"B" earlier application or patent not published on or after the international filing date</p> <p>"C" documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other specific reason (as specified)</p> <p>"D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"E" document published prior to the international filing date but: later than the priority date claimed</p> <p>"F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"G" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"H" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"I" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
27 JUNE 2001 (27.06.2001)		29 JUNE 2001 (29.06.2001)
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daewon, Taejeon-dong, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer LEE, Ye Hyoung Telephone No. 82-42-481-5603

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/KR01/00368

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 95/03293 A	02. 02. 95	AU 7236794 A	20. 02. 95
		CA 2167597 A	02. 02. 95
		CN 1129445 A	21. 08. 96
		EP 710234 A	08. 05. 96
		HU 68558 A	28. 06. 95
JP 60-048924 A	16. 03. 85	DE 3430799 A	14. 03. 85
		EP 135172 A	27. 03. 85
		IT 1179067 A	16. 09. 87

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 河 恵景

大韓民国 ソウル特別市 道峰区 道峰1洞 ソウルガーデンアパート1-408

(72)発明者 宋 啓用

大韓民国 ソウル特別市 瑞草区 方背洞 922-6

Fターム(参考) 4C057 BBO2 BB03 DD01 KK08

4C062 EE63

4C086 AA01 AA02 BA08 EA11 MA01 MA04 MA16 MA23 MA28 MA31

MA35 MA37 MA43 MA52 MA66 NA14 ZA97